

Kombination chemischer, gentechnischer
und enzymatischer Methoden zur Darstellung
schwer synthetisierbarer Proteine:
Möglichkeiten und Grenzen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Dipl.-Chem. Sabine Abel

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Stefan Hecht

Gutachter: 1. Prof. Dr. Oliver Seitz
2. Prof. Dr. Christian P. R. Hackenberger

Tag der mündlichen Prüfung: 22. April 2014

Meiner Familie gewidmet.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Beyermann am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie im Forschungsverbund e.V. (FMP) von Februar 2010 bis September 2013 angefertigt.

Zusammenfassung

Das fibrillen-bildende beta2-Mikroglobulin (b2M) und das CRF1-Mimetikum mit verzweigter Rückgratstruktur können als „schwierige“ Proteine betrachtet werden, deren Darstellung sich eignet, gegenwärtige Möglichkeiten und Grenzen der Proteinsynthese zu ermitteln. Die Proteine sollen zu spektroskopischen Untersuchungen von Proteinfaltung bzw. Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen eingesetzt werden.

Versuche zur Chemosynthese von b2M über drei Segmente führten per NCL zwar zu linearen Produkten mit korrekter Primärstruktur, aber wiederholt wurden zwei, mittels HPLC trennbare Proteine erhalten, deren enzymatische Spaltung zu identischen Fragmenten führte. Eine Isomerisierung (wie z.B. Epimerisierung) als Ursache für die Bildung der zwei Produkte konnte ausgeschlossen werden. Mittels CD- und FTIR-Spektroskopie wurden für beide Produkte beta-Faltblatt-Strukturen ermittelt, die sich sowohl untereinander als auch vom rekombinanten Protein unterschieden. Die „fehlgefalteten“ Syntheseprodukte konnten nicht entfaltet und anschließend in die „korrekte“ Struktur des rekombinanten b2M überführt werden. Es ist denkbar, dass die beobachtete „Fehlfaltung“, deren Ursache nicht geklärt werden konnte, für vom b2M ausgelöste Amyloidosen verantwortlich ist.

Das CRF1-Modell, das aus drei zyklischen Peptiden und einem Protein mit Disulfidbrücken besteht, welche auf einem linearen Peptid-Templat verankert sind, wurde durch ein zyklisches Templat zur strukturellen Einschränkung modifiziert. Durch das zyklische Templat ergaben sich keine Syntheseprobleme, aber interessanterweise führte die Zyklisierung des Templates zu einer signifikant höheren Affinität für den Agonisten Urocortin-I im funktionellen Assay. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass ein zyklisches Rezeptor-Loop-Peptid mittels EPL im mg-Maßstab erhalten werden kann, was künftig die Synthese isotoopenmarkierter Analoga für Struktur-Untersuchungen ermöglicht.

Abstract

The fibril forming beta2-microglobulin (b2m) and the CRF1 mimic with branched peptide backbone could be considered as “difficult” proteins, whose synthesis is suited for determining present possibilities and limits of protein synthesis. The proteins shall be used for spectroscopic analysis of protein misfolding or ligand-receptor-interaction, respectively.

Efforts of the chemosynthesis of b2m over three segments may lead via NCL to linear products with correct primary structure, but two, via HPLC isolatable proteins were repetitively susbstained, whose enzymatic digest lead to identical fragments. An isomerization (such as e. g. epimerization) as reason for the formation of the two products could be excluded. By means of CD and FTIR spectroscopy for both products beta-sheet structure were determined, which differ among themselves as well as from the recombinant protein. The “misfolded” synthetic product could not be unfolded und subsequently converted into the “correct” structure of the recombinant b2m. It is possible that the observed “misfolding”, whose cause could not be clarified, is reasonable for the amyloidosis induced by b2m.

The CRF1 model that consists of three cyclic peptides and one protein with disulfid bridges coupled to a linear peptide template, was modified for structural constraints by a cyclic template. In consequence of the cyclic template no synthetic problems aroused, although the cyclisation of the template leads interestingly to a significant higher affinity for the antagonist urocortin-I in the functional assay. Furthermore, it was shown that a cyclic receptor loop peptide could be received via EPL in mg scale, what in future enables the synthesis of isotopically labeled analogs for structure investigations.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	STAND DER FORSCHUNG.	3
2.1.	Ligations-Methoden.	3
2.1.1.	Segment-Verknüpfung durch chemische Methoden	3
2.1.2.	Ligation durch enzymatische Katalyse	5
2.1.3.	Semi-Synthese	7
2.2.	Das β_2 -Mikroglobulin	10
2.2.1.	Synthese-Strategie	11
2.2.2.	Vorarbeiten zur Darstellung vom β_2 -M	12
2.3.	CRF1-Mimetika.	15
3.	ZIELSTELLUNG	19
4.	ERGEBNISSE & DISKUSSION.	21
4.1.	Chemosynthese des β_2 -Mikroglobulins	21
4.1.1.	Die erste NCL zur Verknüpfung vom Segment B*-SR und Segment C	23
4.1.2.	Die zweite NCL zur Darstellung von linearem β_2 -M (ABC).	24
4.1.3.	Charakterisierung der zwei Ligations-Produkte ABC	25
4.1.3.1.	Absicherung der Primär-Struktur.	25
4.1.3.2.	Ausschluss einer cis/trans-Isomerie am Prolin	30
4.1.3.3.	Nebenprodukt-Bildung während der NCL.	31
4.1.3.4.	Epimerisierung von Asn ₂₄ in der NCL.	44
4.1.3.5.	Unterschiede in der Sekundär-Struktur	46
4.1.3.6.	Denaturierung der linearen β_2 -M-Produkte	48
4.1.4.	Protein-Faltung	52
4.2.	Semi-Synthese und Charakterisierung der CRF1-Mimetika	56
4.2.1.	Das zyklische CRF1-Konstrukt (CRF1 _{zykl})	56
4.2.1.1.	Synthese-Strategie und Realisierung	56
4.2.2.	Expression und Einbau einer Rezeptorloop-Domäne	59
4.2.2.1.	Synthese-Strategie	59
4.2.2.2.	EPL des extrazellulären Loops 2 (ECL _{expr} 2)	59
4.2.3.	Vergleich der Ligand-Bindungs-Eigenschaften von zyklischem und linearem CRF1-Konstrukt.	62
5.	ZUSAMMENFASSUNG & AUSBLICK	65
6.	EXPERIMENTELLER TEIL.	69
6.1.	Materialien und Methoden.	69
6.1.1.	Reagenzien.	69
6.1.2.	Instrumente	69
6.1.3.	Methoden	74
6.2.	Synthesen und Experimente.	76

6.2.1.	Synthese des β_2 -Mikroglobulins	76
6.2.1.1.	Synthese des N-terminalen Segmentes (Segment A-SR).	76
6.2.1.2.	Synthese der N-Boc-Thioazolidin-4-carbonsäure (Boc-Thz-OH).	77
6.2.1.3.	Synthese des mittleren Segmentes (Segment B*-SR)	78
6.2.1.4.	Synthese des C-terminalen Segmentes (Segment C).	80
6.2.1.5.	Erste native chemische Ligation zum Segment B*C.	80
6.2.1.6.	Zweite native chemische Ligation zum linearen β_2 -Mikroglobulin.	82
6.2.1.7.	Faltung zur Tertiär-Struktur des β_2 -Mikroglobulins.	84
6.2.2.	Synthesen der Modellpeptide für Experimente im Zusammenhang der Synthese vom β_2 -Mikroglobulin	86
6.2.2.1.	Benzoyl-LN-p-Acetamidophenol (Bz-LN-SR)	86
6.2.2.2.	Modell-Peptide (1) bis (6) für intramolekulare Zyklisierungs-Untersuchungen (M(1-6)-SR)	87
6.2.2.3.	L-/D-Säuren der Modell-Peptide (1) bis (6) (M(1-6)-OH)	89
6.2.2.4.	L-/D-Segmente als Standards zum Vergleich mit dem Fragment nach dem Chymotrypsin-Verdau vom ABC-Gemisch	93
6.2.2.5.	Experimente im Zusammenhang der Synthese vom β_2 -Mikroglobulin	94
6.2.3.	Synthese der CRF1-Mimetika	99
6.2.3.1.	Biosynthese des Rezeptor-N-Terminus (ECD1)	99
6.2.3.2.	Synthese der linearen CRF1-Konstrukte mit dem exprimierten ECL _{expr} 2.	101
6.2.3.3.	Synthese des zyklischen CRF1-Konstruktes	111
6.2.4.	Biologische Untersuchungen der Mimetika.	116
6.2.4.1.	GTP γ S-Assay.	116
6.2.4.2.	Bindungs-Assay.	116
7.	LITERATURVERZEICHNIS	118
8.	BILDNACHWEIS	125
9.	ANHANG.	126
9.1.	Abkürzungsverzeichnis	126
9.2.	Danksagung	131
9.3.	Veröffentlichungen.	132
9.4.	Selbstständigkeitserklärung	133

1. EINLEITUNG

Die Verleihung des Nobelpreises 2012 an Robert J. Lefkowitz und Brian K. Kobilka für deren Beitrag zum Verständnis der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs)^{[1]-[3]} veranschaulicht das große Interesse für das Verstehen proteinbezogener Prozesse. Trotz bahnbrechender Fortschritte in der Vergangenheit, wie die radioaktive Markierung zur Lokalisierung von Rezeptoren^{[4][5]}, die Isolierung von Rezeptorgen^[6] bis hin zur kürzlich beschriebenen Kristallstruktur des β_2 -adrenergen Rezeptors in seiner aktiven Form^[7], sind die Signal-Transduktionswege noch immer nicht vollständig verstanden. Um einen Einblick in Protein-Mechanismen und Molekül-Erkennung zu bekommen, ist die Kenntnis von Struktur-Funktions-Beziehungen, struktureller Dynamik und der Interaktion zwischen Protein-Domänen grundlegend. Gegenstand der aktuellen Forschung ist verstärkt die Charakterisierung der Bewegung, der Interaktion und der chemischen Umgebung von Makromolekülen in lebenden Zellen, um neben dem Verständnis über diese Prozesse dem Ziel des Designs von künstlichen Enzymen, Antikörpern, Hormonen oder Struktur-Proteinen für pharmazeutische Zwecke näher zu kommen.

Die Untersuchung von Proteinen setzt voraus, dass man ausreichende Mengen isolieren bzw. synthetisieren kann. Die Isolierung der Proteine aus natürlichen Ressourcen liegt erst einmal nahe. Allerdings wird sie häufig durch ungenügende Materialmengen mühsam, unpraktikabel und bedingt eine gewisse Vorkenntnis über die Eigenschaften, welche nicht immer gegeben ist. Also nutzt man die Fähigkeiten der Natur, Proteine zu generieren, und stellt die gewünschten Proteine durch Expression biosynthetisch dar. Dies hat zum Vorteil, dass zum einen eine ausreichende Menge erhalten werden kann und zum anderen durch gezielte Manipulation einzelne Aminosäuren (AS) oder auch ganze Fragmente substituiert werden können.^{[8]-[10]}

Das Verständnis von Protein-Funktionen setzt eine volle Beschreibung post-translationaler Modifikationen, wie Glykosylierungen, Phosphorylierungen und Alkylierungen, und deren Effekte auf intrinsische Funktionen, Stabilität, Lokalisation und dreidimensionale Strukturen voraus. Generell sind dem Einbau nicht-genetischer Strukturen in der Biosynthese von Proteinen Grenzen gesetzt. Die Chemosynthese erweitert das Spektrum der Protein-Synthese um die Möglichkeit D-AS, artifizielle isosterische AS oder post-translationalen Modifikationen zur Untersuchung chemischer Mechanismen einzubringen. Im Gegensatz zur Biosynthese, bei der eine sequenzabdeckende Isotopenmarkierung mit ^{15}N , ^{13}C oder auch ^2H für kern-magnetresonanz spektroskopische (NMR)-Untersuchungen realisierbar ist, kann durch chemische Synthese eine positionsspezifische Isotopenmarkierung oder eine Einbettung von Fluoreszenz-Markern durchgeführt werden. Des Weiteren kann mit Hilfe der Chemosynthese die Struktur manipuliert werden und so einen Einblick in strukturelle Grundlagen, enzymatische Mechanismen oder Molekül-Erkennung ermöglicht werden.

Neben den Vorteilen der Chemosynthese ist diese jedoch sowohl durch die begrenzte Effizienz von Segment-Kupplungen als auch die Länge der mittels Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) darstellbaren Peptid-Segmente begrenzt (40 bis 60 AS). Die Verknüpfung der Vorzüge der Biosynthese zur Darstellung höhermolekularer Proteine mit den Vorteilen der chemischen Variabilität der Chemosynthese beinhaltet das Gebiet der Semi-Synthese. Semi-Synthesen können heute sehr elegant mittels expressed Protein Ligation (EPL) erfolgen. Die EPL lehnt sich an das chemische Verfahren der nativen chemischen Ligation (NCL) an, wobei der Vorgang des Protein-Spleißens ausgenutzt wird.

2. STAND DER FORSCHUNG

Die erfolgreiche Chemosynthese von Proteinen basiert im Wesentlichen auf methodischen Entwicklungen in der Peptidchemie. Hier war sicherlich, neben Fortschritten auf den Gebieten der Schutzgruppen-Chemie^{[11][12]} und Aktivierung von Aminosäuren^{[13]-[16]}, die Einführung der Festphasen-Peptidsynthese nach Merrifield^[17] ein wichtiger Faktor.

2.1. Ligations-Methoden

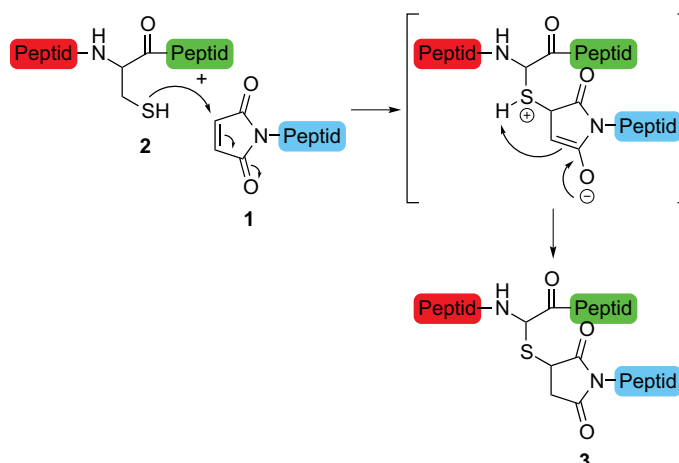
Ein Ansatz zur Synthese von Proteinen besteht in der Verknüpfung von überwiegend geschützten Peptid-Segmenten. Dies birgt jedoch einige Schwierigkeiten. Kupplungsreaktionen von seitenketten-geschützten Segmenten sind auf Grund der schlechten Löslichkeit einerseits schwer handhabbar und andererseits analytisch meist sehr kompliziert zu kontrollieren. Daher wurden Methoden entwickelt, ungeschützte Peptid-Segmente zu legieren. Diese Synthese-Strategie setzt eine hohe Selektivität der Ligations-Methode voraus, um Nebenreaktionen mit anderen, ungeschützten, funktionellen Gruppen der AS-Seitenketten oder Razemisierung zu vermeiden. Für diese Vorgehensweise der Kupplung ungeschützter Segmente sind mehrere Methoden entwickelt worden.

2.1.1. Segment-Verknüpfung durch chemische Methoden

Zur Bildung unnatürlicher Peptid-Bindungen wurden u. a. die Thiol-Maleimid-Kupplung^{[18][19]}, die Pseudoprolin-Ligation^{[19]-[21]} und die „Click“-Kupplung^{[19][22]-[24]} entwickelt.

Bei der Thiol-Maleimid-Kupplung handelt es sich um eine Michael-Addition, wobei das Maleimid den Michael-Akzeptor **1** (α,β -ungesättigte Carbonyl-Verbindung) und der Schwefel des Thiols den Michael-Donator **2**, also das Nukleophil, repräsentieren (Abbildung 1).^{[18][19]} Es findet somit eine Schwefel-Kohlenstoff-Verknüpfung **3** statt. Auf Grund der Tatsache, dass einer der Reaktionspartner ein Thiol, beispielsweise ein Cystein ist, wirkt sich die Anwesenheit mehrerer Cysteine störend auf einen selektiven Verlauf der Reaktion aus. Daher müssen eventuell zusätzlich vorhandene Cysteine für diesen Zweck geschützt werden. Um eine Ligation mit der Aminogruppe der Lys-Seitenketten zu verhindern, darf der pH-Wert, bei dem die Kupplung stattfindet, nicht höher als neun sein. Diese Methodik wird gern für Seitenketten-Verknüpfungen oder zum Einbau von Fluorophoren verwendet.

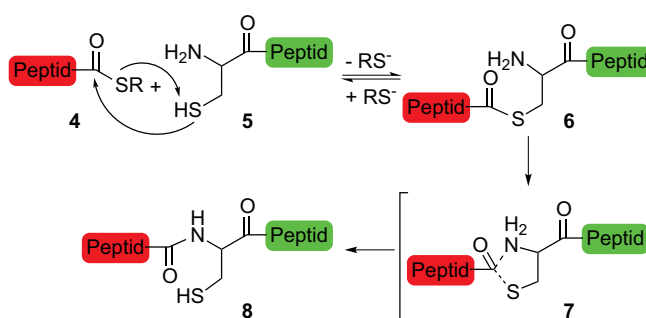
Abbildung 1:
Reaktions-Schema der
Thiol-Maleimid-Ligation



Trotz vieler Vorteile, welche Ligations-Methoden zur Ausbildung unnatürlicher Peptid-Verknüpfungen auszeichnet, wie die hohe Effizienz und Selektivität der Thiol-Maleimid-Ligation, besitzen Verfahren für die Knüpfung natürlicher Peptid-Bindungen einen besonderen Stellenwert.

Die in den meisten Fällen verwendete Ligations-Methode zur Darstellung von Peptid-Bindungen ist die native chemische Ligation. Die NCL hat ihren Ursprung in der Synthese schwefelhaltiger Peptide nach Wieland *et al.* von 1953.^[25] Theoretisch wurde dieses Prinzip erst 1981 von Kemp wieder aufgenommen, wobei es aber noch nicht gelang ein ausgereiftes Verfahren zu entwickeln.^[26] Der Durchbruch kam erst Mitte der 90-iger Jahre. Die NCL beruht auf der Reaktion eines seitenketten-ungeschützten, C-terminalen α -Thioester-Peptides **4** mit einem seitenketten-ungeschützten Peptid **5**, welches ein N-terminales Cystein aufweist (Abbildung 2).^{[27][28]} Diese beiden unterliegen in einer Gleichgewichts-Reaktion einem chemoselektiven Thiol-Austausch. Unmittelbar nach der Thioester-Bildung **6** an der Cystein-Seitenkette findet über einen 5-gliedrigen Übergangszustand **7** eine S \rightarrow N-Acyl-Umlagerung zur Ausbildung des natürlichen Peptid-Rückgrats **8** statt.^{[27][28]}

Abbildung 2:
Reaktions-Mechanismus
der nativen chemischen
Ligation



Wie auch bei den anderen Methoden zur Ligation ungeschützter Peptide, hat die NCL den Vorteil, dass sowohl der Kupplungs-Prozess, als auch die Aufarbeitung des Produktes per reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) unproblematisch ist.^[29] Ein weiterer positiver Aspekt besteht in der einfachen Durchführung der Ligation u. a. im Wässrigen, bei neutralem pH und unter Anwesenheit denaturierender Agenzien.^[29] Zudem zeigt diese Ligations-Methode eine Toleranz gegenüber weiteren Cysteinen in den Peptid-Segmenten auf. An diesen Cysteinen kann zwar auch die Gleichgewichts-Reaktion des Thiol-Austausches stattfinden und somit ein interner Thioester gebildet werden, aber keine darauf folgende Umlagerung zu einem stabilen Produkt.^[29] Daher kann hier auf Schutzgruppen verzichtet werden.

Trotz aller Vorteile der NCL mussten zunächst Verfahren entwickelt werden, um effizient und ohne optischen Verlust (epimerenrein) die benötigten α -Thioester herzustellen. Die optimierte *tert*-Butyloxycarbonyl- (Boc)-Chemie in der SPPS^[30] hat das Problem der Verwendung von korrosiven, starken Säuren, welche in modernen Automaten nicht einsetzbar sind.^[31] Dagegen sind in der leichter automatisierbaren 9-Fluorenylmethoxycarbonyl- (Fmoc)-Strategie vorzeitig existierende Thioester gegenüber Piperidin labil, welches für die Fmoc-Abspaltung erforderlich ist.^[31] Somit wurden verschiedene Möglichkeiten zur Thioester-Gewinnung entwickelt, wie zum Beispiel neue Abspalt-Cocktails für die Fmoc-Schutzgruppe^[32], die Verwendung von „safety-catch“ Linkern^{[33]-[36]}, entsprechende Harzabspaltungen, bei denen erst die Thioester gebildet werden^{[37][38]}, die Ausnutzung eines N \rightarrow S-Acyl-Shiftes zur Bildung des Thioesters^{[39]-[41]}, eine selbstreinigende Methode^{[42][43]} oder nach der Harzabspaltung die Thioester-Bildung an einer seitenketten-geschützten Peptidsäure ohne Razemisierung der C-terminalen AS^{[44][45]}.^[19] Letztere Methode wird in unserem Labor erfolgreich verwendet.

Um die NCL für mehrere aufeinanderfolgende Ligationen anwenden zu können, muss jedoch beachtet werden, dass die Segmente, welche sowohl am C- als auch am N-Terminus eine Kupplungsstelle aufweisen, weder zyklisieren noch polymerisieren. Konzepte, die für diese Problematik entwickelt wurden, beinhalten zum Beispiel die Nutzung von Schutzgruppen, wie die Acetamidomethyl- (Acm)-Schutzgruppe für die Thiol-Seitenkette des Cysteins^{[46][47]}, die Methylsulfonylethoxycarbonyloxy- (Msc)-Schutzgruppe für die Amino-Funktion^{[30][47]} oder das als Thioazolidin geschützte Cystein^{[48]-[50]}. Ein anderer Ansatz sind Ligationen an Festphasen (SPCL)^{[46][47]} oder die Ausnutzung von kinetischer Kontrolle während der NCL^{[50][51]}. Hier profitiert man aus den unterschiedlichen Reaktivitäten von Alkyl- und Aryl-Thioestern.

2.1.2. Ligation durch enzymatische Katalyse

Neben den diversen Fähigkeiten, welche durch die verschiedenen Verfahren der chemischen Ligationen geboten werden, kann man sich zusätzlich der Eigenschaften der enzymatischen Katalyse wie zum Beispiel der Ligasen bedienen. Ligasen sind Enzyme, die unter Energieverbrauch die Verknüpfung zweier Moleküle durch eine kovalente Bindung katalysieren. In die Gruppe

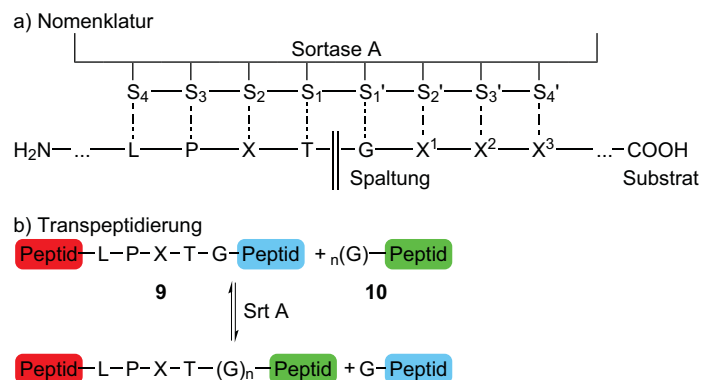
der Ligasen gehören auch die Transpeptidasen. Enzyme dieser Klasse katalysieren chemische Reaktionen (wie die reversible Übertragung eines Peptides auf ein anderes durch Proteasen), in welcher ASs oder Peptide auf andere Amino-Komponenten transferiert werden. Es wird also die Bildung von Amid-Bindungen zwischen Amino- und Carbonylgruppen innerhalb existierender Peptid-Verbindungen katalysiert. Eine Ligase, welche zu diesem Zweck bereits eingesetzt wurde, ist die Sortase A (Srt A)^{[52][53]}.

Die Sortase A ist eine Transpeptidase, welche *in vivo* an der Anknüpfung von Proteinen an bakterielle Peptidoglykane beteiligt ist^{[54][55]} und eine geringe Proteolyse-Aktivität aufweist. Somit stellt eine potentielle Hydrolyse während der Ligation kein Problem dar.^[52] Auf Grund der Tatsache, dass die Srt A eine Erkennungs-Sequenz von fünf AS benötigt^[56], ist keine proteolytische Spaltung und Transpeptidierung an anderer Stelle der Reaktanden zu befürchten.

Bei der Ligation mittels Sortase A werden die Substrate **9** an dem Erkennungs-Motiv, was die AS-Abfolge von LPXTG hat^[56], zwischen dem Threonin und dem Glycin unter Ausbildung eines Threonyl-Thioesters am Cystein der Srt A gespalten und auf ein Oligo-Glycin-Nukleophil **10** übertragen (Abbildung 3).^{[54][55]} In Anwesenheit eines Nukleophils ist die Bildung des Acyl-Enzym-Komplexes geschwindigkeits-bestimmend, wobei unter Abwesenheit eines Nukleophils sehr langsam Hydrolyse stattfindet.^[52]

Abbildung 3:
Sortase A
Transpeptidierung

a) Nomenklatur von
Substrat & Protease nach
Schechter & Berger^[57] auf
die Sortase A angewendet,
b) Reaktions-Schema der
Sortase A-vermittelten
Transpeptidierung



S_{1-4}/S'_{1-4} = Substrat-
Bindungsstellen

Die Sortase A-vermittelte Ligation ist hoch selektiv, da sie am Erkennungs-Motiv nur eine geringe Toleranz aufweist.^{[55][56]} Die Transpeptidierung wird zusätzlich durch die Eigenschaften der

Edukte beeinflusst^[52]. Zudem führen die Verwendung eines Eduktes im Überschuss sowie das Entfernen eines Produktes zur weiteren Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung der Transpeptidierung.

Neben der hohen Selektivität sind die milden Reaktions-Bedingungen bei dieser Ligation von Vorteil. Sie kann in wässrigen, neutralen Puffern und sogar in Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln und ohne die Zugabe von Thiolen oder anderer Reduktionsmittel durchgeführt werden.^{[52][53]} Daher ist sie für die Ligation labiler Substrate, die zum Beispiel Disulfid-Brücken oder glykosylierte Einheiten beinhalten, hervorragend geeignet. Natürlich kann der Vorteil der Selektivität für das LPXTG-Motiv auch als eine Limitierung der Sortase A-vermittelten Ligation diskutiert werden. Eine Lösung für die Einschränkung der Anwendung der Srt A auf das LPXTG-Erkennungs-Motiv konnte durch eine Mutante der Sortase A erzielt werden. Diese toleriert anstelle des Leucins ein weites Spektrum an AS für die erste Position des Erkennungs-Motivs.^[58]

2.1.3. Semi-Synthese

Möchte man einen Schritt weiter gehen und sich zusätzlich der Vorteile der biochemischen Synthese bedienen, bietet das Protein-Spleißen eine wichtige Grundlage. Biochemische Verfahren stellen eine Verknüpfung biologischer und chemischer Verfahren dar. Die Biosynthese bedient sich rekombinanter DNA zur Expression der gewünschten Proteine.^{[10][31]} Die rekombinante Expression hat den Vorteil, dass zum einen größere Mengen und zum anderen längere AS-Sequenzen als in der Chemosynthese realisiert werden können.^[59] Sollen außer den natürlich vorkommenden AS unnatürliche eingebaut werden, so kann man für Strukturanaloga der natürlichen ASs die „forced biosynthetic incorporation“ nutzen.^[10] Andere Möglichkeiten positionsspezifischer Inkorporationen jeglicher unnatürlicher AS sind Techniken, die auf der Entwicklung der Synthesen von suppressor tRNA oder engineered tRNA basieren.^[8] Generell wird die Biosynthese korrekt gefalteter Proteine auf Grund von Aggregation limitiert und kann Modifikationen nur homogen und nicht positionsspezifisch hervorrufen, wie Isotopenmarkierungen oder post-translationale Modifikationen.^{[31][59]} Hier setzt die Semi-Synthese an, welche eine Kombination der Chemo- und Biosynthese beinhaltet.

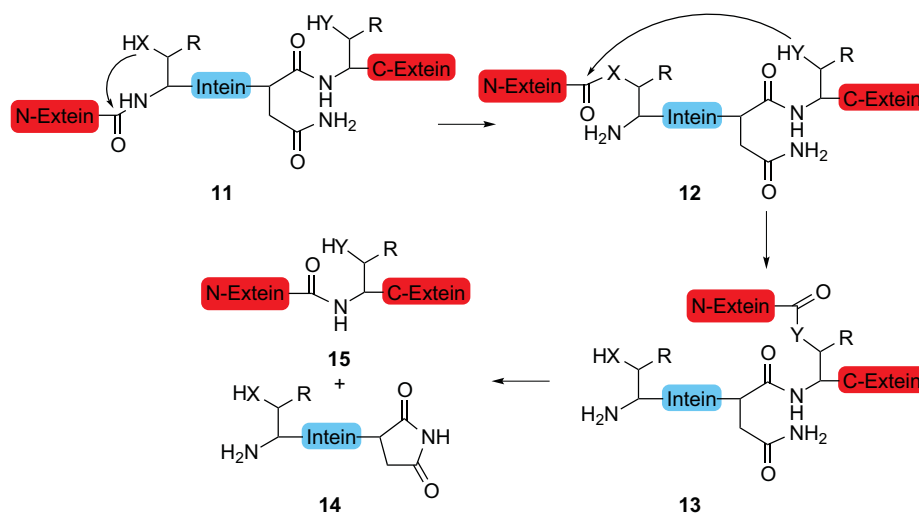
Für die Entwicklung der Semi-Synthese war die Klärung des Mechanismus des Protein-Spleißens ein ausschlaggebender Punkt. Die bislang etabliertesten Techniken der Semi-Synthese, die EPL und das trans-Spleißen, beruhen auf der Manipulation dieses Mechanismus. Für die Aufklärung des Protein-Spleißens war das mechanistische Verständnis der NCL von grundlegender Bedeutung, da hier ähnliche Abläufe stattfinden.

Das Spleißen findet an Positionen statt, an denen sich Serin, Threonin oder Cystein befinden. Im ersten Schritt wird die N-terminale Spleiß-Position durch eine N→O/S-Acyl-Umlagerung aktiviert **11** (Abbildung 4). Dies führt zu einer zwischenzeitlich linearen Verknüpfung des

N-Exteins an der Ser/Thr/Cys-Seitenkette des Inteins in Form eines (Thio-)Esters **12**. Anschließend findet eine intramolekulare trans-(Thio-)Umesterung statt. Dabei wird der Acylrest des N-Exteins von der Seitenkette der N-terminalen AS des Inteins auf die N-terminale Ser/Thr/Cys-Seitenkette des C-Exteins übertragen. Es entsteht dadurch ein verzweigtes Protein-Intermediat **13** mit zwei N-Termini, gehörend zum N-Extein und Intein, und einer (Thio-)Ester-Verbrückung zwischen dem N-Extein und dem C-Extein mit einem Ser/Thr/Cys als Verknüpfungsstelle. Die Spaltung der Peptid-Hauptkette findet durch die Ausbildung eines Succinimides **14** durch die Zyklisierung des C-terminalen Asparagins des Inteins statt, was den Aufbruch der Peptid-Bindung zwischen Intein und C-Extein mit sich führt. Abschließend findet analog der NCL eine spontane O/S→N-Acyl-Umlagerung der seitenketten-verbrückten Exteine zu einer Amid-Bindung **15** statt. Das Selbst-Spleißen lässt vermuten, dass die Spleiß-Positionen eine sehr strikte chemische, elektronische und sterische Spezifität bedingen und zudem AS im Protein dem Spleißen assistieren, indem sie die Intermediate stabilisieren oder als Protonen-Donatoren oder -Akzeptoren fungieren.^[60]

Abbildung 4:
Mechanismus des
Protein-Spleißens

mit X,Y = O/S für
Ser&Thr/Cys und
R = H/Me für
Ser&Cys/Thr



In der EPL manipuliert man die Inteine dahingehend, dass entweder C-terminale Thioester oder N-terminale Cysteine generiert werden, welche beide für eine darauf folgende NCL mit einem chemosynthetischen Peptid eingesetzt werden können. Will man einen Thioester erhalten, so nutzt man ein mutiertes Spleiß-Protein, was auf der Stufe eines Thioester-Intermediates (**13** mit Y = S) stehen bleibt.^{[61][62]} Durch Zusatz eines entsprechenden Thiols (Thiophenol, 2-Mercaptoethansulfonat-Natrium (MESNA)) kann nach Thiol-Austausch der Thioester **16** für die NCL gewonnen werden.^{[62][61][62]} Dieses Konzept kann natürlich auch für die

Semi-Synthese zyklischer Peptide und Proteine genutzt werden, indem das zu zyklisierende Molekül zwischen zwei entsprechend manipulierten Inteinen **17** eingebaut wird (Abbildung 5)^[62].

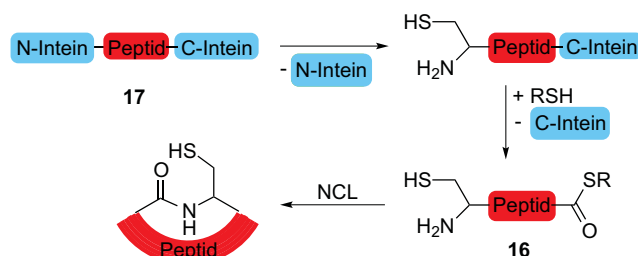


Abbildung 5:
Mechanismus der EPL zur
Bildung eines zyklischen
Peptides

Die verschiedenen Verfahren in der Chemo-, Bio- und Semi-Synthese bieten ein weites Spektrum an Möglichkeiten für die Darstellung von Proteinen. Auf Grund der unterschiedlichen Eigenschaften, Modifikationen und Fragestellungen, welche sich hinter der Aufgabe der Synthese eines gewünschten Proteins verbergen, müssen für ein jedes Protein entsprechende Synthese-Strategien entwickelt und diese Verfahren zielgerichtet optimiert werden.

In der Peptid-Synthese sind sogenannte „schwierige“ Peptide bekannt. Das sind Peptide, die durch das Auftreten sterischer Hinderungen oder starker Assoziationsphänomene und damit verbundener Löslichkeitsprobleme, schwer synthetisierbar sind. Mit analogen Problemen muss man ebenso bei Synthesen entsprechender Proteine rechnen. Es sollten deshalb chemische, gentechnologische und enzymatische Methoden dahingehend getestet werden, mit welchem Erfolg „schwierige“ Proteine, wie solche, die sehr stark zur Fibrillen-Bildung neigen, hergestellt werden können. Dafür wurde das β_2 -Mikroglobulin (β_2 -M) als Modellverbindung gewählt, weil bereits Erfahrungen hinsichtlich der Schwierigkeit seiner Chemosynthese vorlagen^{[63][64]}, das mittels Expression gewonnene Zielprotein zum Vergleich vorhanden war, und letztlich ortsspezifisch isotoopenmarkiertes Protein zum Abschluss von Untersuchungen zur Faltungsdynamik dringend notwendig war. Als zweiten Untersuchungsgegenstand wurde die Synthese eines extrazellulären Rezeptor-Modells vom CRF1-Rezeptor gewählt. Gegenüber dem bekannten Konstrukt^{[65][66]} sollte kein lineares Peptid-Templat zum Anknüpfen der extrazellulären Loop-Strukturen und des Rezeptor-N-Terminus genutzt, sondern die Flexibilität der Rezeptor-Domänen durch Verwendung eines zyklischen Peptid-Templates eingeschränkt werden.

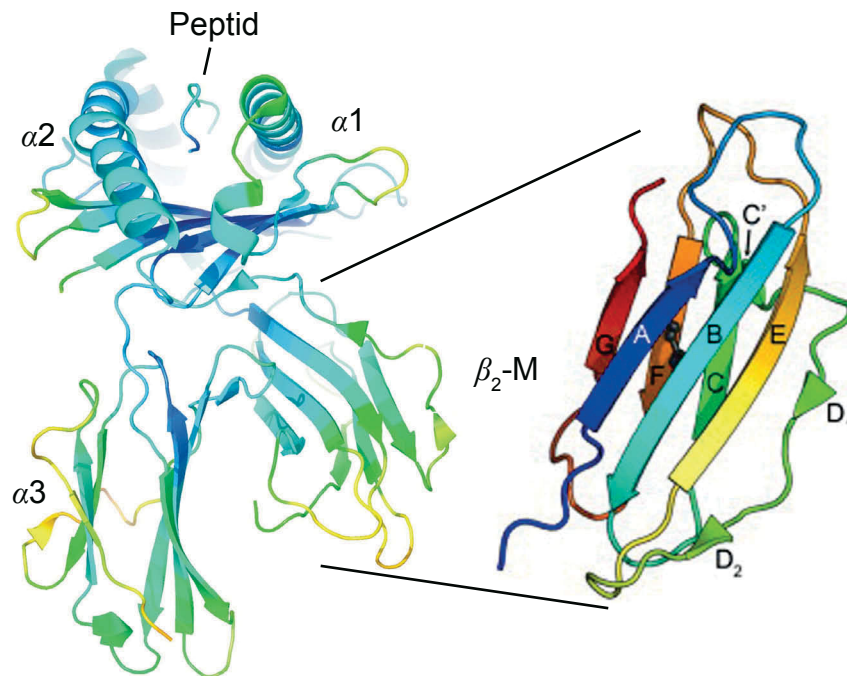
2.2. Das β_2 -Mikroglobulin

Das Ligations-Verfahren der NCL soll im Rahmen der Untersuchungen bezüglich der Realisierbarkeit der Chemosynthese von fibrillären Proteinen, im speziellen von β_2 -Mikroglobulin-Derivaten, untersucht werden. Das Interesse an β_2 -Mikroglobulin begründet sich auf seiner pathologischen Auswirkung durch Protein-Fehlfaltung.

Das β_2 -M ist ein 11.7 kDa schweres Protein, was aus 99 AS aufgebaut ist.^[67] Es bildet die leichte, nicht-kovalent gebundene Kette des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (MHC) (Abbildung 6).^[68]

Abbildung 6:
MHC und
 β_2 -Mikroglobulin

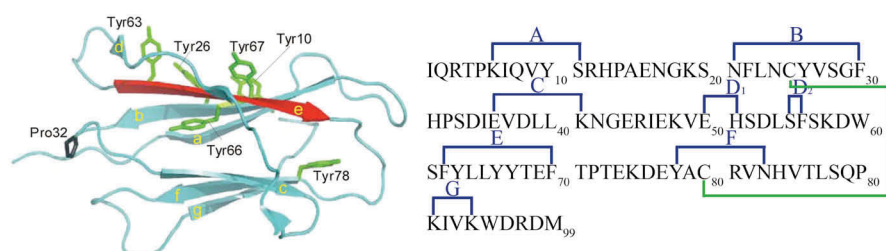
Bändermodelle der
Kristallstrukturen
vom MHC mit Peptid
(links)^[1] und vergrößertem
Ausschnitt vom β_2 -M
(rechts)^[2]



Das β_2 -Mikroglobulin besteht aus einem sieben-strängigen β -Sandwich mit Immunglobulin-Faltung.^{[67][68]} Aufgebaut wird diese Struktur aus zwei antiparallelen β -Faltblättern, welche durch eine Disulfid-Brücke (Cys₂₅-Cys₈₀) stabilisiert werden (Abbildung 7).^{[67][68]} Dabei besteht das eine Faltblatt aus vier Strängen (A₆₋₁₁, B₂₁₋₃₀, D₅₀₋₅₆, E₆₂₋₇₀) und das andere aus drei Strängen (C₃₆₋₄₁, F₇₈₋₈₃, G₉₁₋₉₄).^{[67][68]}

Abbildung 7:
 β_2 -Mikroglobulin

Bändermodell mit
Orientierung der Tyr-
Seitenketten und der
Pro₃₂-Seitenkette
(links)^[3] und AS-Sequenz
mit Kennzeichnung der
einzelnen β -Faltblätter
(blau) & der Disulfid-
Brücke (grün, rechts)



Das medizinische Interesse am β_2 -Mikroglobulin begründet sich damit, dass es die Ursache für die dialysebedingte Amyloidosis (DRA) bei Hämodialysepatienten ist.^[69] Bei Langzeit-Dialysepatienten wird das β_2 -M beim MHC-Abbau wegen derer Nierenfehlfunktion nicht mehr katabolisiert und zudem nicht vollständig während der Dialyse entfernt.^{[69][70]} Dies führt zu einer erhöhten Konzentration an β_2 -M in der Blutbahn, wo es durch Fehlfaltung amyloide Fibrillen ausbildet, welche in den Bewegungsapparat gelangen.^{[69][71][72]} Diese Ablagerungen im Gelenkwasser können zum Beispiel zu Knochenzysten oder dem Karpal-Tunnel-Syndrom führen.^[71]

Bislang ist lediglich bekannt, dass die amyloide Struktur auf Grund allosterisch kontrollierter Konformations-Änderungen hervorgerufen wird.^[72] Weiter ist das native β_2 -Mikroglobulin als Monomer in Lösung stabil und kann *in vitro* durch Initiation zur Ausbildung der amyloiden Formation angeregt werden. Normalerweise ist der Prozess der Fehlfaltung langsam, aber Untersuchungen haben ergeben, dass die Fibrillen-Bildung durch Impfen und/oder die Zugabe von Kupfer-II-Ionen, von Detergenzien oder organischen Co-Solventien ausgelöst werden kann.^{[73]-[75]}

Da der Bildungs-Mechanismus und die komplette Struktur der amyloiden Fibrillen noch nicht geklärt ist, sollen an dieser Stelle infrarot (IR)-spektroskopische Untersuchungen einen Einblick erlauben. Hierfür sollen positionsspezifisch isotoopenmarkierte β_2 -M-Derivate dargestellt werden, was durch Chemosynthese realisiert werden soll.

2.2.1. Synthese-Strategie

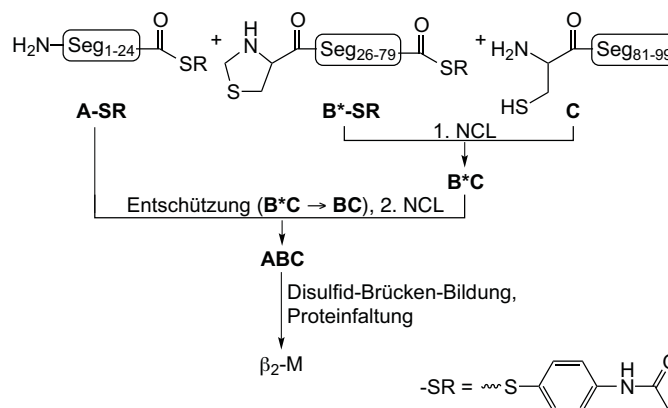
Die Synthese des β_2 -Mikroglobulins wurde in zwei vorhergehenden Arbeiten (Dissertation B. Briand^[63] & Diplomarbeit S. Abel^[64]) mit folgender Synthese-Strategie bereits angegangen.

Bei den zu synthetisierenden β_2 -M-Derivaten soll jeweils ein Tyrosin, dessen Seitenkette in das Innere des Proteins zeigt, an der C4-Position des Phenol-Ringes ¹³C-markiert werden, um durch Veränderungen der [¹³C]-Tyr-Bande während IR-spektroskopischer Untersuchungen Rückschlüsse auf die Umgebung dieser Tyrosine ziehen zu können^{[76]-[78]}. Das β_2 -Mikroglobulin besitzt insgesamt sechs Tyrosine^{[67][68]}, wobei lediglich die Seitenketten der Tyrosine an Position 66 und 78 in die Struktur hinein weisen^{[67][68]} (siehe Abbildung 7) und somit von Relevanz für faltungskinetische Untersuchungen sind.

Die Tatsache, dass das β_2 -M an den Positionen 25 und 80 Cysteine aufweist^[67], legt eine Synthese-Strategie nahe, die auf der nativen chemischen Ligation aufbaut (Abbildung 8). Mit dem Konzept der NCL ergeben sich für das β_2 -Mikroglobulin retrosynthetisch drei Peptid-Segmente, welche mittels automatisierter SPPS synthetisiert werden können.^{[63][64]}

Abbildung 8:
Synthese-Strategie für das
 β_2 -Mikroglobulin

SPPS der Peptid-Segmente
(A-SR, B*-SR, C),
Schrittweise Kupplung der
einzelnen Segmente per
NCL,
anschließende Ausbildung
der Disulfid-Brücke und
Proteinfaltung



Diese Segment, aus den sich das β_2 -M zusammensetzt, sind das N-terminale Peptid A (Seg₁₋₂₄), das mittlere Segment B (Seg₂₅₋₇₉) und das C-terminale Segment C (Seg₈₀₋₉₉). Für die Ligationen per NCL, welche üblicherweise in C→N-Richtung vollzogen werden, muss das N-terminale Cystein des mittleren Segmentes B geschützt werden (B*). Hier wurde das Thioazolidin ausgewählt, ein als Pseudoprolin geschütztes Cystein^[48]. Zur Aktivierung der C-Termini des N-terminalen Segmentes A und des mittleren Segmentes B* wurde der literaturbekannte *para*-Acetamidophenyl-Thioester gebildet (A-SR, B*-SR).^{[44][79]-[85]} Da im Rahmen erster Arbeiten (Promotion B. Briand) die Ausbeuten für die beiden NCLs nur jeweils 18 % betrugen^[63], sollte darauf aufbauend die Einsetzbarkeit der Gelfiltration für eine verlustärmere Aufreinigung anstatt der üblich verwendeten RP-HPLC untersucht werden (Diplomarbeit S. Abel^[64]).

2.2.2. Vorarbeiten zur Darstellung vom β_2 -M

Im Rahmen vorangegangener Arbeiten in unserem Labor (Dissertation B. Briand^[63]) wurde 1.2 mg gefaltetes synthetisches β_2 -Mikroglobulin dargestellt, was für die geplanten spektroskopischen Untersuchungen nicht ausreichend war. Dies war den geringen Ausbeuten der beiden Ligationen geschuldet, welche nach Reinigung jeweils nur 18 % Ausbeute hervorbrachten.^[63] Dieses synthetische β_2 -M besaß die für das natürliche β_2 -Mikroglobulin charakteristischen IR-spektroskopischen Banden für die antiparallele β -Faltblatt-Struktur (schwache $\approx 1683\text{ cm}^{-1}$ & starke $\approx 1632\text{ cm}^{-1}$) und eine Bande, welche vermutlich auf eine turn-artige Struktur zurückzuführen ist (schwache $\approx 1670\text{ cm}^{-1}$).^[78] Auffällig war, dass das synthetische β_2 -M Unterschiede zum rekombinanten (rek.) β_2 -M in der IR-spektroskopischen Charakterisierung zeigte (Abbildung 9)^[63]. Daraus muss geschlossen werden, dass das

synthetische Protein nicht ausreichend sauber war. Dies zeichnete sich in den Spektren der matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation gekoppelt mit einer time of flight/time of flight-MS (MALDI-MS) ab (Abbildung 10)^[63]. Hier waren neben dem zum β_2 -Mikroglobulin gehörigen, gekennzeichneten Masse-Peak (m/z) von 11 730 Da $[M+H]^+$ die dazugehörigen zweifach ($\approx 5\,867$ Da) und eventuell dreifach ($\approx 3\,542$ Da) und vierfach ($\approx 2\,795$ Da) geladenen Peaks zu sehen. Obwohl letztere starke Abweichungen bezüglich ihrer theoretischen Masse aufzeigten. Zusätzlich wies das Masse-Spektrum des chemischen Synthese-Produktes ein weiteres Signal, Masse-Peak (m/z) von ca. 9 351 Da auf, das auf eine entsprechende Verunreinigung der Probe hindeutete.



Abbildung 9:
FTIR-Spektren vom
synthetischen β_2 -M von B.
Briand (rot) & vom rek.
 β_2 -M (schwarz)

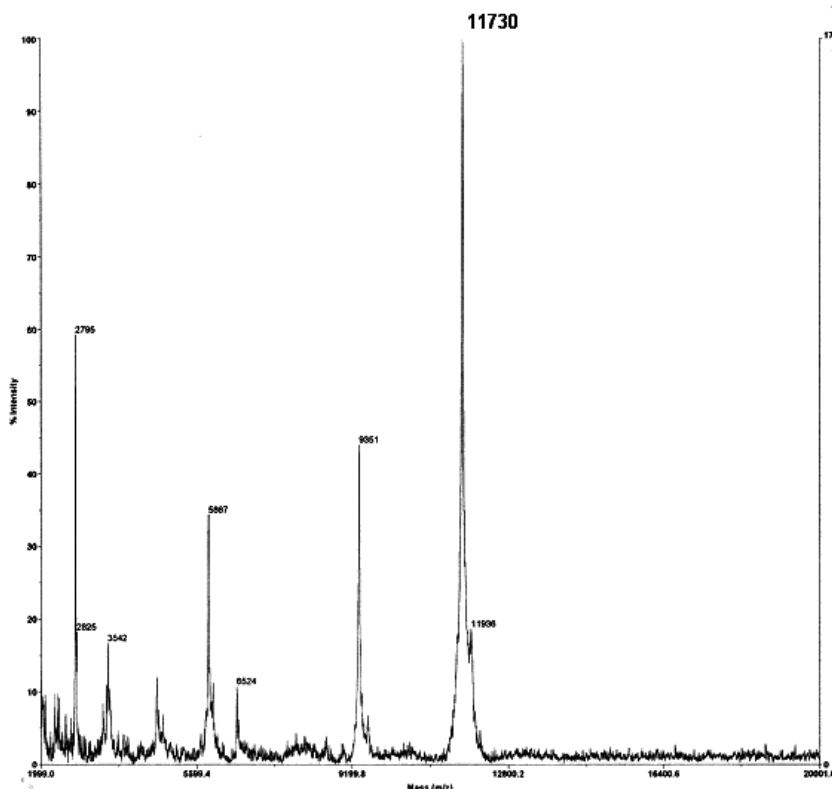


Abbildung 10:
MALDI-Massespektrum
vom synthetischen β_2 -M
aus der Dissertation
B. Briand^[3]

Wegen der geringen Protein-Ausbeute und unzureichend analogen IR-spektroskopischen Eigenschaften zum rekombinanten β_2 -M (Promotion B. Briand^[63]), wurde die automatisierte SPPS der einzelnen Peptid-Segmente optimiert (Diplomarbeit S. Abel^[64]). Des Weiteren wurden dabei die chemischen Ligationen hinsichtlich ihrer Ausbeuten verbessert und die Gelfiltration als Alternative zur üblichen RP-HPLC-Reinigung der Produkte untersucht.

Die Optimierung der Fmoc-SPPS der Peptid-Segmente führte dazu, dass die Synthese der Segmente **A-SR** und **B*-SR** unter Verwendung von Pseudoprolin-Dipeptiden^{[48][86][87]} durchgeführt wurde, ohne die bei beiden Synthesen ein hoher Anteil an Abbruchsequenzen auftrat, was für **B*-SR** mit einer Länge von 55 Aminosäuren zu erwarten ist. Für die Synthese der Asp-haltigen Peptid-Segmente **B*-SR** und **C** wurden zur Inhibition der Aspartimid- und Piperidid-Bildung^{[88][89]} das TentaGel-S-2-Chlortrityl-chlorid-Harz (ClTrt-Cl-Harz)^[90], die *tert*-Butyl (*t*Bu)-Schutzgruppe für Asp^[91] und ein Zusatz von 1 % HCOOH (FA) in der 20 %-igen Piperidin-Abspalt-Lösung verwendet^[92]. Im Fall des Segmentes **B*-SR** wurde die zeit- und sequenzabhängige Trifluoracetylierung^[93] nach der Trifluoressigsäure- (TFA)-vermittelten Abspaltung durch anschließende Behandlung im wässrigen Milieu rückgängig gemacht. Die S-*tert*-Butylsulfonium-Bildung am Methionin des Segmentes **C** während der sauren Schutzgruppen-Abspaltung wurde durch Behandlung bei erhöhter Temperatur in Wasser ebenfalls umgekehrt^{[94][95]}.^[64]

Die erste NCL zur Bildung von **B*C** verlief ohne Probleme, aber für die zweite NCL zur Kupplung von **A-SR** mit **BC** wurde die Bildung eines Nebenproduktes beobachtet, dessen Identität nicht geklärt werden konnte. Für die zweite NCL wurde weiterhin beobachtet, dass eine Herabsetzung des pH-Wertes auf 6.4 eine höhere Effizienz ergibt. Für die Reinigung der Produkte nach den NCLs erbrachte die Anwendung der Gelfiltration für die erste NCL eine gute Ausbeute, für die zweite NCL war sie aber deutlich weniger erfolgreich. Die Limitierung der Gelfiltration besteht hier darin, dass die sauren Bedingungen für das β_2 -M zu einer Initiierung von Aggregation und Fibrillen-Bildung führt.^[64]

Im Ergebnis gelang es auch im Rahmen dieser Arbeiten (Diplomarbeit S. Abel^[64]) nicht, ausreichende Mengen von β_2 -Mikroglobulin (1.6 mg ungefaltetes β_2 -M/**ABC**) darzustellen. Zudem war das Ligations-Produkt **ABC** auch hier nicht rein, wie dessen MALDI-Massespektrum zu entnehmen ist (Abbildung 11)^[64]. Neben dem Masse-Peak (*m/z*) für das Produkt mit 11 838 Da, ist im Massebereich um 9 000 Da ein Nebenprodukt nachweisbar. Dieser Peak könnte auf Verunreinigung des Zielproteins durch das Segment **BC** hinweisen.

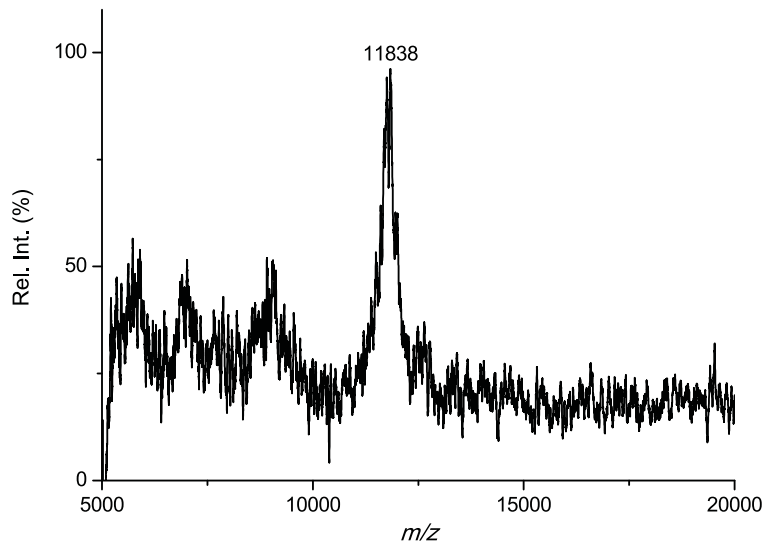


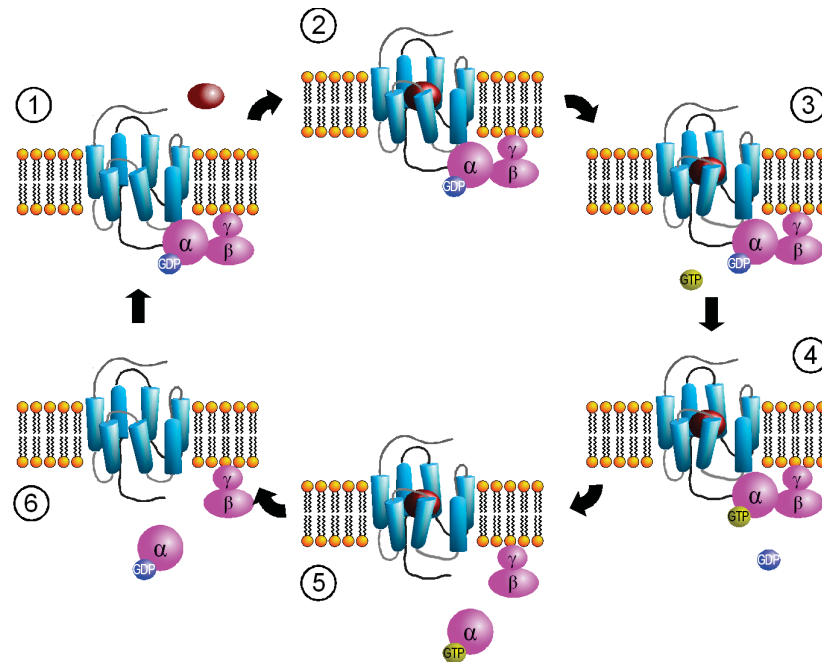
Abbildung 11:
MALDI-Massenspektrum
von ABC aus der
Diplomarbeit S. Abel^[64]

2.3. CRF1-Mimetika

Der Corticotropin-Releasing Factor Receptor, Typ 1 (CRF1) gehört zu den eingehend in ihrer Bedeutung unterstrichenen G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCRs)^{[1][96]}, welche eine große Überfamilie an Rezeptoren bilden, die Signale über die Zellmembran hinweg in das Zellinnere leiten^{[2][97]}. Das Signal kann dabei u. a. ein Photon oder ein Peptid-Ligand sein. Dies führt zu einer intrazellulären Interaktion des Rezeptors mit einem G-Protein und einer anschließenden Aktivierung eines Sekundär-Messengers (Abbildung 12).^{[98][99]} Im Falle des CRF1 ist dieser Ligand das Hormon Corticotropin-Releasing Factor (CRH)^[96] oder verwandte Peptide wie das Urocortin^[100] oder Sauvagin^[101]. Im zytosolischen Bereich wird nach Interaktion mit dem G-Protein unter anderem der Metabolismus des zyklischen Adenosinmonophosphates aktiviert^{[96][100][101]}, was in einer vermehrten Ausschüttung von Corticotropin resultiert^[102]. Dies führt letzten Endes zu einer breiten Spanne von Stress-Anpassungen.^{[96][102]}

Abbildung 12:
GPCR-Zyklus

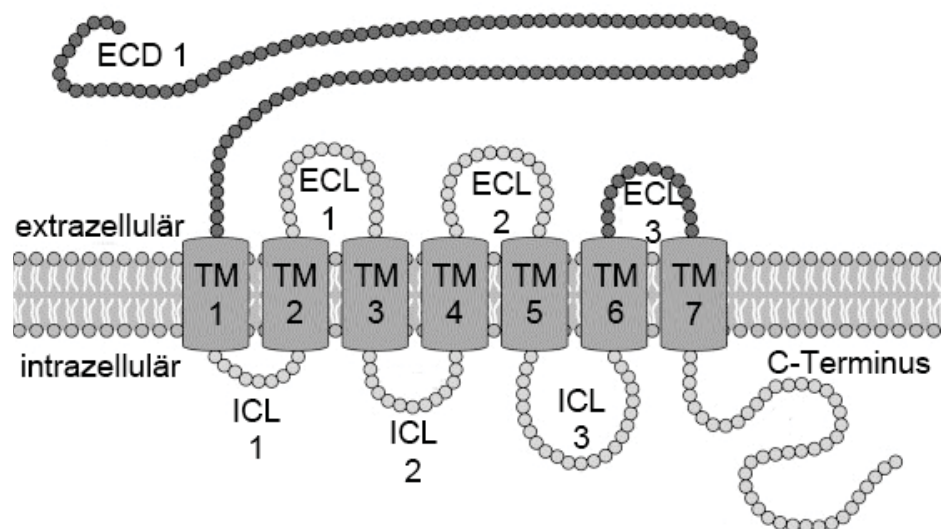
1. Bindung G-Proteins
2. Ligand-Rezeptor-Komplex Ausbildung
3. Rezeptor-Aktivierung
4. G-Protein-Aktivierung
5. G-Protein-Dissoziation und Signaltransduktion
6. G-Protein-Inaktivierung^[5]



Der CRF1 ist aus 415 AS aufgebaut und besteht, wie alle GPCRs, aus einem einzigen Strang, der sieben Mal die Zellmembran durchläuft^[98] (Abbildung 13) und somit sieben Transmembran-Domänen aufweist^{[102], [96], [103], [104]} Daraus ergibt sich ein Aufbau aus vier intrazellulären Domänen (drei Loops und das C-terminale Ende) und vier extrazellulären Domänen (ECD), das N-terminale Ende (ECD1) und die drei extrazellulären Loops (ECL1-3).

Abbildung 13:
Schematische Darstellung
des CRF1

- ECD...extrazelluläre
Domäne
ECL...extrazellulärer
Loop
ICL...intrazellulärer Loop
TM...
Transmembran-Domäne^[4]



Die extrazellulären Domänen repräsentieren wahrscheinlich die Hauptbindungsstelle für die peptidischen Liganden, was durch eine Vielzahl von experimentellen Befunden gesichert ist.^{[105]-[107]} Die Probleme bei der Gewinnung ausreichender Proteinmengen zur

spektroskopischen Strukturanalyse von GPCRs, im besonderen Maße im Fall der Klasse B, führte zur Entwicklung eines Proteinmodells für die extrazellulären Bindungsstellen, basierend auf einer Kombination der extrazellulären Domänen (ECD1, ECL1-3) auf einem linearen Peptid-Templat^{[65][66]} (Abbildung 14). Besonders interessant war dabei der Befund, dass ein solches Konstrukt eine nanomolare Bindungskonstante für den natürlichen Liganden Urocortin-1 zeigt.^{[65][66]}

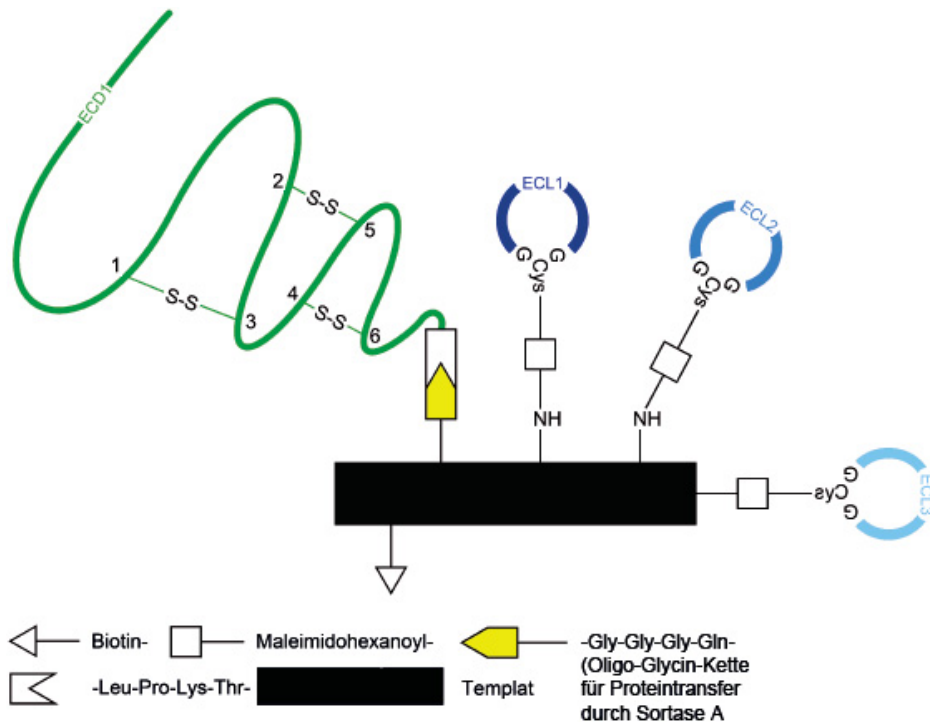
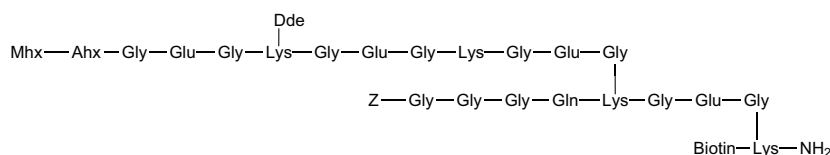


Abbildung 14:
Schematische Darstellung
des CRF1-Konstruktes

Da noch keine experimentellen Daten für die Struktur dieser Rezeptor-Klasse bekannt sind, sollte dieses Templat keine strukturellen Einschränkungen aufweisen.^{[65][66]} Daher wurde großer Wert auf die Flexibilität der einzelnen Domänen gelegt, was eine Selbstorganisation durch spezifische Wechselwirkungen untereinander und in Gegenwart des Liganden ermöglichen sollte.^{[65][66]} Grundbausteine für das lineare Templat des CRF1-Mimetikums, welches nach dem Konzept templat-assoziiierter Konstrukte^{[108][109]} aufgebaut wurde, waren Gly, Lys und Glu (Abbildung 15).^{[65][66]} Zudem wurde Biotin zur Fixierung für anschließende Bindungs-Assays eingebaut.^{[65][66]}

Abbildung 15:
Gerüst des linearen
Templates vom
CRF1-Mimetikum



Mhx...
Maleimidohexansäure
Ahx...ε-Aminohexansäure
Z...Benzyloxycarbonyl-
Schutzgruppe

Das Templat wurde durch Standard-SPPS synthetisiert. Die extrazellulären Loops wurden über die Thiol-Maleimid-Ligation an einem Maleimidohexansäure (Mhx)-Rest, der über einen aktivierten Ester an den Lys-Seitenketten eingebracht war, gekoppelt. Bei den ECL1-3 wurde dessen Topologie beibehalten, d. h., dass sie ihrer natürlichen AS-Sequenz entsprechen. Lediglich interne Cysteine wurden gegen Ala bzw. Ser ausgetauscht^{[65][66]}, was für den nativen Rezeptor keinen Effekt auf dessen hoch affine Bindung zum Peptid-Liganden hat^[110]. Dies war nötig, da die Loops nach Aufbau ihrer AS-Sequenz über Fmoc-SPPS per NCL über eine G-CG-Ligations-Stelle zyklisiert werden sollten.^{[65][66]} Auch hier wurde zur Aktivierung des C-Terminus der Acetamidothiophenol-Ester genutzt (siehe oben).^{[65][66]} Die zur Thiol-Maleimid-Ligation der ECL1-3 orthogonale Einführung des N-Terminus wurde durch eine Sortase A-vermittelte Ligation realisiert, wofür am N-Terminus das für die Sortase A zwingend notwendige Erkennungs-Motiv^[56] in der AS-Abfolge LPKTG eingeführt wurde.^{[65][66]} Die Synthese des langen N-Terminus wurde biosynthetisch durchgeführt.^{[65][66][107]}

Bindungs-Untersuchungen mittels eines Scintillation-Proximity Assays (SPA) haben gezeigt, dass das CRF1-Konstrukt sowohl Urocortin, als auch Sauvagin bindet.^{[65][66]} Letzteres ist bemerkenswert, da der Rezeptor-N-Terminus keine Bindung gegenüber Sauvagin aufweist.^[107] Es konnte zwar eine hohe Affinität zum Urocortin mit einem K_d : ≈ 70 nM bestimmt werden^{[65][66]}, jedoch ist diese schlechter als die des CRF1 im G-Protein-ungekoppelten Zustand (HEK-293-Zellen; K_d : ≈ 4 nM^[111]). Trotzdem bot dieses Mimetikum eine gute Grundlage für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Auswirkung einer strukturellen Stabilisierung des Konstruktes durch ein zyklisches Templat. Wegen der hohen Affinität des Protein-Modells für die natürlichen Peptid-Liganden wäre es von besonderem Interesse mittels spektroskopischer Methoden wie NMR-Spektroskopie oder Röntgenbeugungs-Analyse einen Einblick in die strukturellen Voraussetzungen der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung zu erhalten, um in der Folge ein erstes Bindungsmodell für diese Rezeptor-Klasse zu entwickeln.

3. ZIELSTELLUNG

Mit der Einführung der verschiedenen Ligations-Methoden in die Protein-Chemosynthese, insbesondere der nativen chemischen Ligation, wurden die Grenzen zur Darstellung kleiner Proteine wesentlich erweitert, was sich u. a. in der Darstellung von Ribonuklease A^[112], vom „kovalenten Dimer“ des HIV-1 Protease Enzymes^[50] oder der Eintopf-Synthese des Crambins^[49] widerspiegelt. Wenig ist in der Literatur dagegen über die gegenwärtigen Grenzen der Protein-Synthese zu finden. Diese Grenzen können einerseits, wie im Fall der Peptid-Synthese als sogenannte „schwierige“ Peptide bekannt, durch strukturbedingte Eigenschaften des aufzubauenden Moleküls gegeben sein, indem schon Partialsequenzen, die zum Aufbau verknüpft werden sollen, schlecht oder nicht löslich sind. Andererseits kann sich die Schwierigkeit der Protein-Synthese aber auch aus einer nicht linearen Topologie eines Modell-Proteins ergeben, welche die Kombination einer Reihe orthogonaler Ligations-Verfahren und semi-synthetischer Methoden zur Protein-Herstellung erfordert.

Die bisherigen Erfahrungen, die wir bei der Chemosynthese des β_2 -Mikroglobulin machen mussten^{[63][64]}, haben uns deutlich gemacht, dass dieses stark zur Aggregation und Fibrillen-Bildung neigende Protein^[67] ein sehr gutes Beispiel für ein „schwer synthetisierbares“ Protein ist und wir hier die Möglichkeiten und Grenzen der gegenwärtigen Protein-Synthese-Methodik demonstrieren können. Die Wahl dieses Proteins ist darüber hinaus auch dadurch sinnvoll, weil wir rekombinant synthetisiertes Protein für einen direkten Strukturvergleich zur Verfügung hatten. Ferner sollte uns eine erfolgreiche Chemosynthese positionsspezifisch isotopenmarkierter β_2 -M-Derivate in die Lage versetzen, IR-spektroskopische Untersuchungen zum Faltungsablauf dieses für die Amyloidose verantwortlichen Proteins^[69] abschließen zu können, welche bereits mit unmarkiertem Protein durchgeführt wurden^[78].

Für ein zweites Problem der Semi-Synthese, der Synthese eines Proteins mit nichtlinearer Topologie des Rückgrates ist die Synthese eines ersten Protein-Modells für die extrazelluläre Bindungs-Domäne des CRF1-Rezeptors ein interessantes Beispiel. Für dessen Darstellung wurde die kombinierte rekombinante, enzymatische und chemische Synthese-Strategie in unserem Labor entwickelt^{[65][66]}. Diese Protein-Synthese-Strategie sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erweitert werden, indem die extrazellulären Domänen (ECL1-3) mittels expressed Protein Ligation an Stelle der SPPS dargestellt werden. Hintergrund für diesen methodischen Ansatz war es, ein Verfahren zu entwickeln, das uns in die Lage versetzt, die extrazellulären Domänen in ^{13}C - und ^{15}N -markierter Form zu erhalten, um mittels NMR-gestützter Strukturanalyse einen Einblick in Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zu erhalten und daraus ein erstes Bindungsmodell für diese Rezeptor-Klasse zu entwickeln. Dies setzt die Entwicklung eines effizienten EPL-Protokolls für die Expression zyklischer Peptide voraus. Parallel zu diesen methodischen Arbeiten sollte

geklärt werden, ob sich aus einer Verringerung der strukturellen Flexibilität des Peptid-Templates - etwa durch eine Zyklisierung - veränderte Bindungs-Eigenschaften für das Rezeptor-Konstrukt ergeben, die für weiterführende strukturanalytische Untersuchungen relevant sein könnten.

4. ERGEBNISSE & DISKUSSION

Die hier beschriebenen Arbeiten verfolgten grundsätzlich zwei Ziele. Einerseits sollte versucht werden, die zuvor beobachteten Schwierigkeiten bei der Chemosynthese des fibrillen-bildenden Proteins β_2 -Mikroglobulin zu beseitigen (Promotion B. Briand^[63], Diplomarbeit S. Abel^[64]), wobei es im Wesentlichen darum ging, die Qualität des synthetischen Proteins zu verbessern. Als Qualitätsstandard galt dafür das rekombinant exprimierte Protein und dessen Struktur. Verbunden mit der Überwindung der Syntheseschwierigkeiten war eine ortsspezifische Isotopenmarkierung von β_2 -M für IR-spektroskopische Untersuchungen zur Proteinfaltung das Ziel.

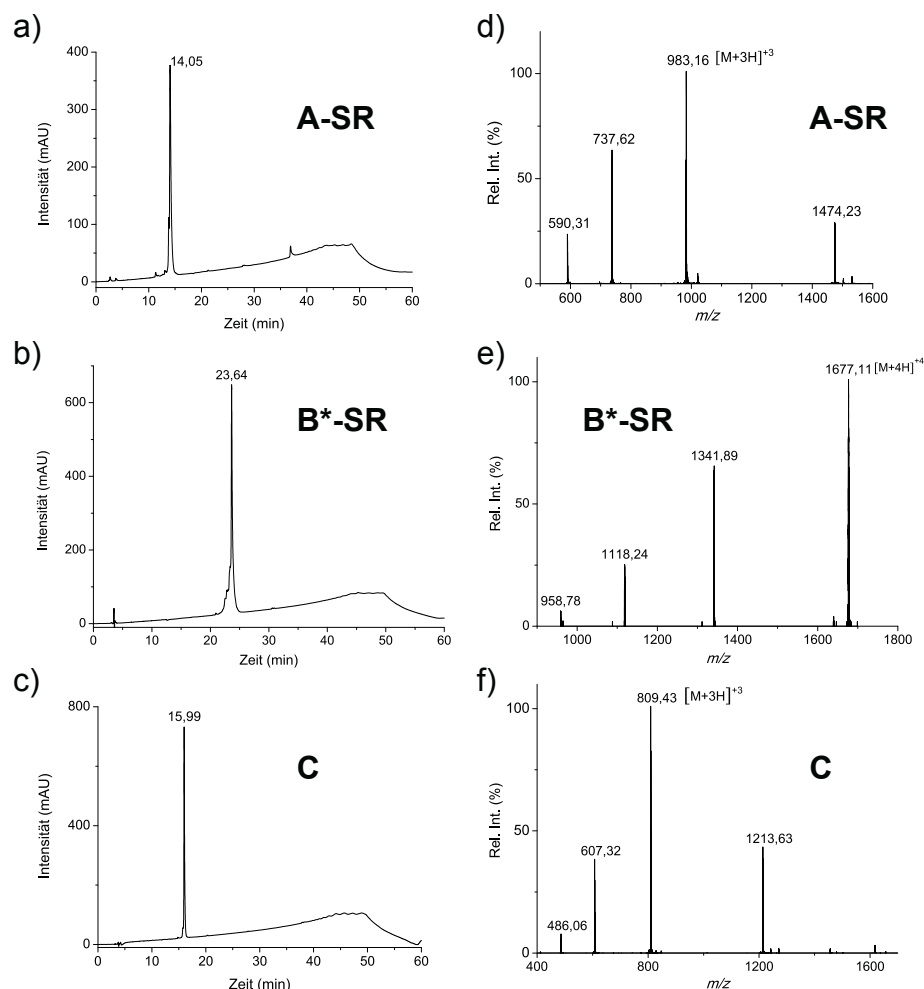
Andererseits sollte für ein Modell-Protein, das ein verzweigtes Proteinrückgrat besitzt und somit nicht direkt über eine Expression in isotoopenmarkierter Form für NMR-spektroskopische Untersuchungen zugänglich ist, versucht werden, die Expression einer Partialsequenz (zyklischen Peptids) als methodische Variante zur partiellen Markierung des Modell-Proteins in die Synthesestrategie einzubauen. Dabei sollte auch geklärt werden, ob ein zyklisches Peptid-Templat gegenüber einem linearen zur Ankopplung der extrazellulären Ligand-Bindungs-Domänen eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors die Bindung der natürlichen Peptid-Liganden noch verbessern kann.

4.1. Chemosynthese des β_2 -Mikroglobulins

Auf der Basis der optimierten Bedingungen zur automatisierten Fmoc-SPPS der drei Segmente des β_2 -M (Diplomarbeit S. Abel^[64]) wurden durch Reinigung mittels RP-HPLC chromatografisch einheitliche Peptide von **A-SR**, **B*-SR** und **C** reproduzierbar erhalten (Abbildung 16). In analoger Weise wurden die isotoopenmarkierten Segmente $^{13}\text{C-Tyr}_{66}$ **B*-SR** und $^{13}\text{C-Tyr}_{78}$ **B*-SR** ebenfalls in mehreren Chargen in hoher Reinheit dargestellt und ihre Identität massenspektrometrisch nachgewiesen (siehe Experimenteller Teil).

Abbildung 16:
Exemplarische Analysen
der reinen Segmente vom
 β_2 -M

a), b) & c) sind die RP-
HPLC-Chromatogramme
(UV-Detektion: 220 nm),
d), e) & f) sind die ESI-
ToF-MS-Spektren (m/z)
von A-SR, B*-SR & C



Für die Synthese des β_2 -Mikroglobulins wurde ein Konzept der schrittweisen Verknüpfung per NCL in Lösung verfolgt, welches eine Reinigung der intermediären Produkte beinhaltet. Eine andere Möglichkeit hätte eine Eintopf-Synthese, wie sie zum Beispiel für die Crambin-Synthese^[49] beschrieben wurde, sein können. Solche Eintopf-Synthesen haben jedoch den Nachteil, dass sie meist unter geringeren Peptid-Konzentrationen (2 mg/ml^[49]) ausgeführt werden, was zu längeren Reaktionszeiten führt. Zudem sind hier die Ausbeuten meist geringer als bei schrittweiser Ligation. Eine andere Möglichkeit hätte in der SPCL bestanden, welche allerdings ein größeres Repertoire an zu beachtenden und damit zu optimierenden Parametern bedeutet hätte. Dazu wären Untersuchungen hinsichtlich eines geeigneten Harzes, Linkers und geeigneter Schutzgruppen notwendig gewesen, wobei der Mehraufwand unter Berücksichtigung der meist geringeren Ausbeute im Vergleich zur NCL in Lösung nicht gerechtfertigt wäre. Zudem kann, basierend auf dem Einsatz eines Phenyl-Thioesters, auf den Zusatz entsprechender Thiophenole während der NCL verzichtet werden. Diese werden häufig der Ligations-Lösung zugesetzt, wenn weniger reaktive

Alkyl-Peptid-Thioester zum Einsatz kommen, um intermediär durch Thiol-Austausch einen reaktiveren Peptid-Thioester zu generieren.^[113]

Die einzelnen Peptid-Segmente wurden also schrittweise per NCL in Lösung ohne Thiol-Zusätze verknüpft. Die Reinigung der Ligations-Produkte sollte ursprünglich mittels Gelfiltration stattfinden. Dieses Vorgehen wurde schließlich aufgegeben, da sich die Gelfiltration zwar nach der ersten NCL als Aufarbeitung eignet, für die zweite Ligation jedoch eine sehr ungenügende Produktqualität erreicht wurde.^{[63][64]}

4.1.1. Die erste NCL zur Verknüpfung vom Segment B*-SR und Segment C

Die Bildung von B*C durch native chemische Ligation von B*-SR an C fand in einem wässrigen Puffer mit 6 M Guanidin-Hydrochlorid (Gn•HCl) als Denaturierungsmittel bei pH 6.0 und einer Gesamt-Peptid-Konzentration von 13 mg/ml statt.

Diese Ligation verlief in mehreren Ansätzen laut RP-HPLC und massenspektrometrie-gekoppelter Flüssigkeitschromatografie (LC-MS) nahezu vollständig und ohne eine signifikante Bildung von Nebenprodukten. Die anschließende Gelfiltration führte im Durchschnitt in 32 %-iger (maximal 50 %) Ausbeute zum gewünschten Produkt, wobei nicht geklärt werden konnte, warum die in einem ersten Versuch erzielte Ausbeute von 74 %^[64] nicht mehr reproduziert wurde. Da die präparative RP-HPLC bessere Ausbeuten lieferte, wurde die Reinigung mittels Gelfiltration in der Synthese-Strategie für das β_2 -Mikroglobulin ersetzt. Es konnte gemäß der analytischen Verfahren (RP-HPLC und LC-MS) ein einheitliches Ligations-Produkt B*C mit Ausbeuten von bis zu 60 % erhalten werden (Abbildung 17). Um eine Dimerisierung durch Disulfid-Bildung am N-terminalen Cystein von B zu vermeiden, wurde das zur Ligation eingesetzte Thioazolidin auch während der Reinigung beibehalten.

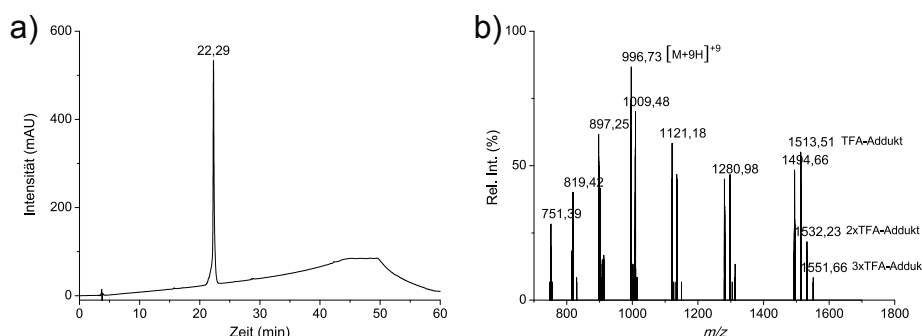


Abbildung 17:
Exemplarische Analyse
vom reinen B*C-Segment
nach der 1. NCL für die
 β_2 -M-Synthese

a) RP-HPLC-
Chromatogramm
(UV-Detektion: 220 nm),
b) ESI-ToF-MS-Spektrum
(m/z)

Es konnte gezeigt werden, dass die Synthese von **B*****C** effizient und reproduzierbar in exzellenter Reinheit erfolgte.

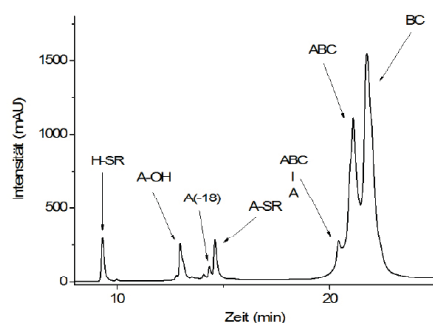
4.1.2. Die zweite NCL zur Darstellung von linearem β_2 -M (ABC)

Zur Bildung von linearem **ABC** aus **A-SR** und **B*****C** musste zunächst das N-terminale Cystein von **B*****C** entschützt werden (**B*****C** \rightarrow **BC**), damit es anschließend mit **A-SR** die Ligation eingehen kann. Das verlief wiederholt glatt, indem man **B*****C** in einer Lösung von 6 M Gn•HCl, 0.2 M MeO-NH₂ bei einem pH-Wert von 4.0 (Peptid-Konz. 6 mg/ml) für vier Stunden bei 37 °C rührt, wobei keine anschließende Reinigung notwendig war.

Im Gegensatz zur ersten Ligation verlief die zweite NCL unter Standard-Bedingungen mit gravierenden Schwierigkeiten, denn diese Reaktion fand unter einem enormen Verlust an Thioester **A-SR** mit sehr schlechter Ligations-Effizienz statt. Nach zwei Stunden Ligation ist neben den Edukten **A-SR** und **BC** das gewünschte Produkt **ABC** nachweisbar. Für das Ergebnis der Nebenprodukt-Bildung dieses Ligations-Schrittes ist ein repräsentatives Beispiel, wie es für mehrere Ligations-Ansätze unter analogen Bedingungen erhalten wurde, in Abbildung 18 dargestellt.

Abbildung 18:
Nebenreaktionen während
der 2. NCL zur Bildung
von **ABC**

RP-HPLC-
Chromatogramm
(UV-Detektion: 220 nm)
was die Nebenprodukt-
Bildung der NCL
nach zwei Stunden
Reaktionszeit zeigt.



Das RP-HPLC-Chromatogramm verdeutlicht, dass eine Reihe von Nebenprodukten entsteht, die in der Folge massenspektrometrisch identifiziert werden konnten. Es handelte sich dabei um einen „internen“ Thioester **ABC(A)**, welcher durch Acylierung

des internen Cysteins (Cys₈₀) mit **A-SR** am Ligations-Produkt **ABC** entstand. Zudem wurde die Säure **A-OH** des eingesetzten Thioesters **A-SR** identifiziert. Überraschenderweise wurde zusätzlich noch das Entstehen eines weiteren Nebenproduktes beobachtet. Dieses wies eine Massedifferenz von -18 Da in Bezug auf die Säureform des Segmentes **A** auf, **A(-18)**.

Während der Aufarbeitung der Ligations-Lösung wurden unerwartet zwei massenspektrometrisch identische, aber mittels RP-HPLC trennbare Produkte mit der für das Zielprotein **ABC** charakteristischen Masse identifiziert (Abbildung 19). Die Gelfiltration erwies sich nicht nur für die Trennung dieser beiden Produkte, sondern auch für die Abtrennung der anderen Nebenprodukte als wesentlich ineffizienter als die RP-HPLC und stellt somit im Gegensatz zu früheren Befunden (Diplomarbeit S. Abel^[64]) keine Alternative dar.

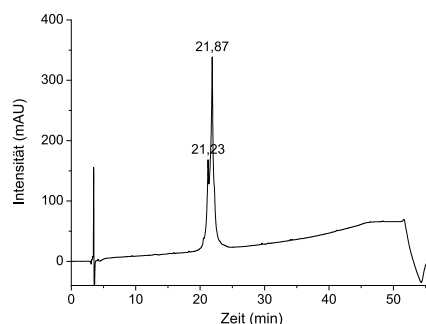


Abbildung 19:
ABC-Produkt-Gemisch
nach der 2. NCL

RP-HPLC-
Chromatogramm
(UV-Detektion: 220 nm)

4.1.3. Charakterisierung der zwei Ligations- Produkte ABC

Das Entstehen zweier massenspektrometrisch scheinbar identischer **ABC**-Ligations-Produkte bei der NCL von **A-SR** und **BC** warf die Frage auf, ob beide Produkte bedingt durch die Limitierungen der verwendeten massenspektrometrischen Methode nicht unterscheidbar waren oder ob es sich um isomere Proteine handeln könnte. Es könnte sich aus einer chemischen Modifizierung wie etwa durch eine Oxidation des C-terminalen Methionins^[114] oder eine Disulfid-Bildung über die Cystein-Seitenketten eine geringe Massedifferenz ergeben, die mittels MALDI-MS für große Moleküle innerhalb des Fehlers der Methode liegt.

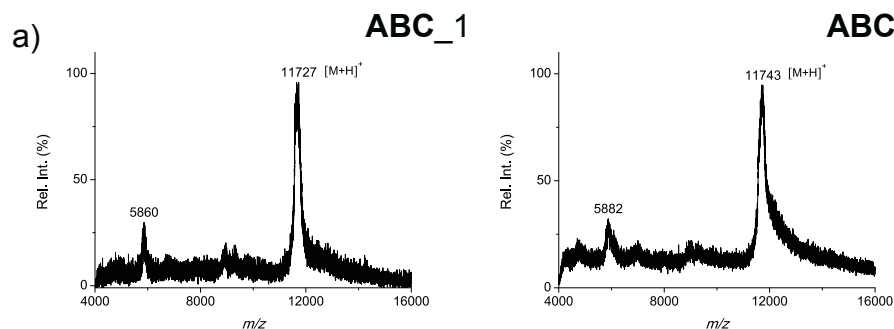
4.1.3.1. Absicherung der Primär-Struktur

Um abzuklären, ob der Doppelpeak in der RP-HPLC nach der NCL (siehe Abbildung 19) mit einer Oxidation am Methionin (Massedifferenz: +16 Da) zu begründen ist, wurde das Gemisch beider **ABC**-Produkte mittels Trimethylsilylbromid und Ethandithiol zur Reduktion eines potentiellen Sulfoxides behandelt^[114]. Da dies keine messbare Veränderung des Doppelpeaks bei der Analyse mittels RP-HPLC hervorrief (nicht gezeigt), handelte es sich bei keinem der beiden Ligations-Produkte um ein Oxidations-Produkt am Methionin. Zur weiteren Untersuchung wurden die beiden **ABC**-Produkte **ABC_1** (früher eluierendes **ABC**-Produkt) und **ABC_2** (später eluierendes **ABC**-Produkt) mittels

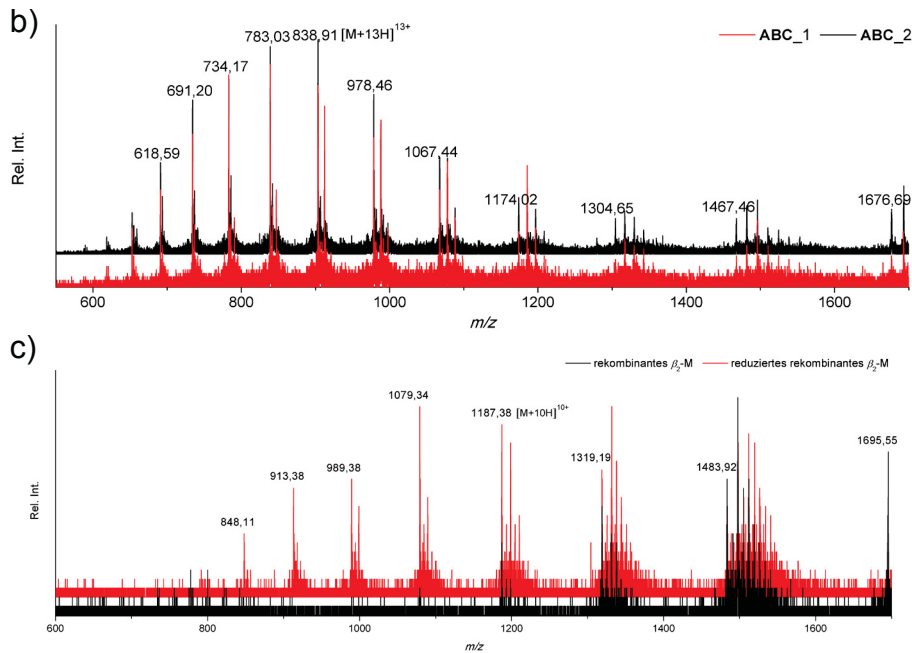
präparativer RP-HPLC isoliert. Die verwendete MALDI-MS-Methode im Linear Middle Mass Mode für den Bereich von Molekular-Massen zwischen 2 000 und 30 000 Da weist einen Messfehler von bis zu $\pm 0.5\%$ auf. Dies spiegelt sich auch in den MALDI-Massespektren von **ABC_1** und **ABC_2** wider (Abbildung 20a). Ausgehend von einer durchschnittlichen theoretischen Masse von 11 731 Da für das lineare β_2 -Mikroglobulin ist die Abweichung in den per MALDI-MS gemessenen Massen für **ABC_1** mit 4 Da und die für **ABC_2** mit 12 Da zwar geringer, als der angegebene Toleranzbereich, aber immer noch nicht aussagekräftig genug. Besser ist hier die Messmethode der elektron-spray ionization time of flight-MS (ESI ToF MS), welche eine Auflösung von 100 ppm hat. Hier ist ausgehend vom $[M+10H]^{10+}$ -Peak eine Masse von 11 730 Da für **ABC_1** (rot) und ebenfalls von 11 730 Da für **ABC_2** (schwarz) bestimmt worden (Abbildung 20b). Zudem ist die Tatsache, dass die ESI-ToF-Massespektren nahezu übereinstimmen eine Bestätigung dafür, dass keines der beiden Produkte ein oxidiertes Methionin besitzt. Durch das Ergebnis der ESI-ToF-MS kann für eine Differenzierung zwischen **ABC_1** und **ABC_2** zwar eine chemische Modifikation ausgeschlossen werden, die eine Massedifferenz von mehr als 2 Da bewirken würde, jedoch konnte auf Grund der Auflösung des verwendeten ESI-ToF-MS-Gerätes zwischen freien Thiolen und einer internen Disulfid-Brücke nicht unterschieden werden. Um dies zu prüfen, wurden das rekombinante β_2 -Mikroglobulin und dessen Reduktionsprodukt vermessen. Ein Vergleich des Spektrums des reduzierten rekombinanten β_2 -M (rot) mit dem des rekombinanten β_2 -M (schwarz) zeigt ein nahezu übereinstimmendes Peak-Muster (Abbildung 20c), weshalb eine Differenzierung zwischen den beiden Formen - Disulfid-Brücke vorhanden oder freie Cysteine vorhanden - unmöglich ist.

Abbildung 20:
Masse-Spektren der
ABC-Produkte und
des rekombinanten
 β_2 -Mikroglobulin

a) MALDI-Massespektren
vom **ABC_1** (links)
& **ABC_2** (rechts)
(Messungen im Linear
Middle Mass Mode)



Auf der folgenden Seite...



b) Gestaffelte ESI-ToF-MS-Spektren (m/z) vom **ABC_1** (rot) & **ABC_2** (schwarz)
c) Gestaffelte ESI-ToF-MS-Spektren (m/z) vom rekombinanten (schwarz) und reduzierten rekombinanten β_2 -M (rot)

(Das rekombinante β_2 -M ist um 131,2 Da schwerer als das native β_2 -M, da es am N-Terminus auf Grund der Expression ein zusätzliches Methionin besitzt. Der Übersicht halber wurden die Peaks der ein- und mehrfachen TFA-Addukte nicht gekennzeichnet.)

Deshalb sollte nun durch chromatografische Retentionszeit-Vergleiche mit dem authentischen Standard geklärt werden, ob es sich bei **ABC_1** und **ABC_2** um oxidierte und reduzierte Formen vom β_2 -M handelt. Das rekombinante β_2 -Mikroglobulin wurde mit Tris(2-carboxyethyl) phosphin-Hydrochlorid (TCEP•HCl) reduziert. Die isolierten **ABC**-Produkte wurden nun mit dem rekombinanten β_2 -M in der oxidierten und in der reduzierten Form per analytischer RP-HPLC verglichen (Abbildung 21). Auf Grund identischer Retentionszeiten wurde das **ABC_1** der oxidierten Form (Disulfid-Brücke vorhanden) und das **ABC_2** der reduzierten Form (freie Cysteine vorhanden) zugeordnet.

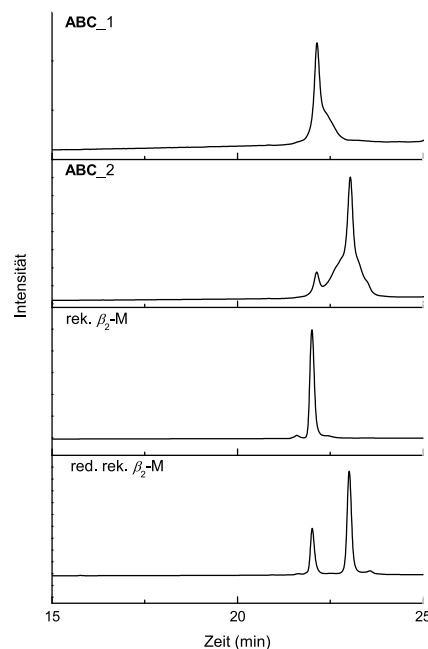


Abbildung 21:
Gegenüberstellung
der RP-HPLC-
Chromatogramme von den
ABC-Produkten & dem
rek. β_2 -M

Dargestellt sind von oben nach unten die Chromatogramme (UV-Detektion: 220 nm) vom isolierten **ABC_1**, isolierten **ABC_2**, rek. β_2 -M & für eine Stunde mit TCEP•HCl reduziertem rek. β_2 -M.

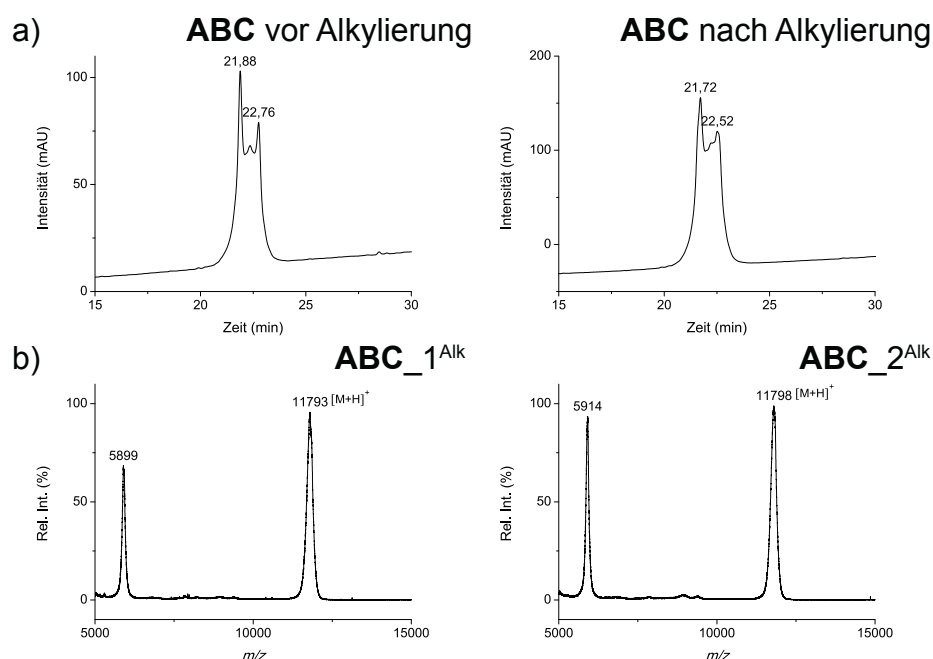
Diese Zuordnung von **ABC_1** und **ABC_2** als oxidierte bzw. reduzierte Form sollte nun durch die Reduktion eines Gemisches beider mit TCEP•HCl und anschließender RP-HPLC kontrolliert werden. Eine Bestätigung würde aus der Abnahme des Peaks für **ABC_1** nach der Reduktion resultieren. Überraschenderweise wurde das Peak-Verhältnis

von **ABC_1** zu **ABC_2** im Chromatogramm jedoch nicht messbar verändert (nicht gezeigt), was bedeutet, dass ausgeschlossen werden kann, dass **ABC_1** das Disulfid von **ABC_2** ist.

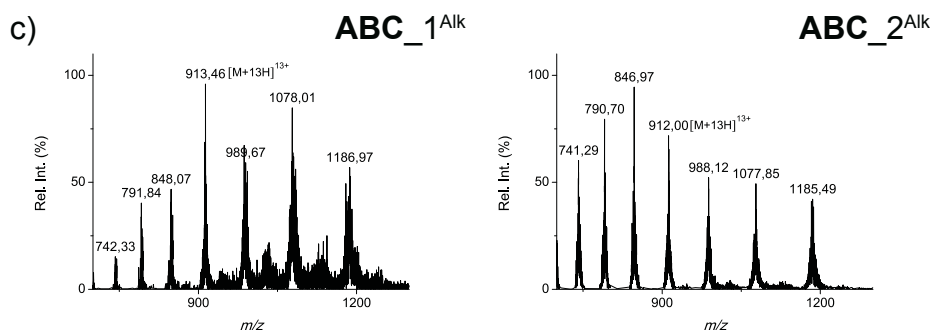
Eine weitere Bestätigung für das Vorliegen freier Thiole lieferte die Alkylierung mit Iodacetamid.^[115] Dies ist eine Methode bei der freie Thiole in Proteinen alkyliert werden. Hier wäre in einem Retentionszeit- und Masse-Vergleich zu erwarten, dass ein Disulfid unverändert bleibt. Freie Thiole würden zweifach alkyliert werden, was zu einer Veränderung des Retentionsverhaltens und einer Erhöhung der Masse um 114 Da führen sollte. Für diese Untersuchung wurde eine Probe eines Gemisches aus **ABC_1** und **ABC_2** mit Iodacetamid behandelt, wobei für beide Formen eine parallele Verschiebung der Produktpeaks entlang der Zeitachse des RP-HPLC-Chromatogramms zu beobachten war (Abbildung 22a). Nach der Alkylierung wurde das Gemisch aufgetrennt, wobei drei Fraktionen (zuerst eluierendes Derivat **ABC_1^{Alk}**, Gemisch, und später eluierendes Derivat **ABC_2^{Alk}**) isoliert wurden, welche chromatografisch hinreichend gereinigt waren. Diese Fraktionen wurden per MALDI-MS und ESI-ToF-MS untersucht (Abbildung 22b, c) und wiesen für alle Fraktionen einen Masseshift von ca. 114 Da auf, was jeweils einer doppelten Alkylierung entspricht. Auf Grund des einheitlichen Masseshiftes ist klar, dass sich hinter **ABC_1** und **ABC_2** kein Gemisch aus linearem β_2 -M und dessen Disulfid verbirgt, sondern in jedem Fall freie Cysteine vorliegen

Abbildung 22:
Analytik zur Alkylierung
vom **ABC**-Gemisch

a) RP-HPLC-
Chromatogramme
(Detektion: 220 nm)
vom **ABC**-Gemisch vor
(links) & nach (rechts) der
Alkylierung,
b) MALDI-Massespektren
(Messungen im Linear
Middle Mass Mode),



Auf der folgenden Seite...



c) ESI-ToF-MS-Spektren (m/z , mit 0.1 % FA) nach der Alkylierung vom isolierten **ABC_1^{Alk}** (links) & **ABC_2^{Alk}** (rechts)

Anzumerken ist hier, dass die ESI-ToF-MS-Messungen zur besseren Ionisierung in Gegenwart von Ameisensäure^{[116][117]} an Stelle von Trifluoressigsäure (TFA) durchgeführt wurden. Mit TFA wurden unter ansonsten analogen Bedingungen keine Protein-Ionen detektiert.

Für eine endgültige Bestätigung, dass es sich bei beiden chemosynthetischen β_2 -M-Produkten um die unmodifizierte Primär-Struktur handelt, wurden die isolierten Produkte **ABC_1** und **ABC_2** getrennt einem enzymatischen Verdau unterzogen und die entstandenen Peptid-Fragmente anschließend massenspektrometrisch identifiziert. Zur Analyse wurden MALDI-MS-Messungen sowohl mit der Peptide Mode Messmethode für den Molekül-Massebereich von 600 Da bis 3 000 Da, als auch mit der Messmethode Linear Middle Mass Mode gemacht. Die ersten MALDI-Massespektren wiesen für beide **ABC**-Produkte viele Fragmente mit mehreren Fehlsplattstellen für Chymotrypsin und Trypsin auf, daher wurde ein Nachverdau durchgeführt. Die Auswertung der Spektren ergab für beide Produkte, **ABC_1** und **ABC_2**, eine komplette und identische Sequenz-Abdeckung ohne massenspektrometrisch nachweisbare Modifikationen (Tabelle 1 & 2).

Fragment	Masse berechnet	Masse gefunden	Spaltenzym
1-6 ^a	742.5	742.5	Trypsin
1-10 ^a	1245.7	1245.8	Chymotrypsin
1-19 ^a	2222.2	2222.2	Trypsin
71-78 ^a	982.4	982.6	Chymotrypsin
92-97 ^a	816.5	816.5	Trypsin
92-99 ^a	1062.5	1062.6	Trypsin
95-99 ^a	722.3	722.3	Trypsin
1-19 ^b	2222	2226	Trypsin
1-41 ^b	4700	4704	Trypsin
1-45 ^b	5157	5157	Trypsin
1-48 ^b	5527	5528	Trypsin
23-56 ^b	3890	3894	Chymotrypsin
76-97 ^b	2657	2661	Trypsin
76-99 ^b	2903	2907	Trypsin
82-99 ^b	2166	2170	Trypsin

Tabelle 1:
Gefundene Fragmente
nach Verdau von **ABC_1**

Messungen mittels
MALDI-MS
a...im Peptide Mode
b...im Linear Middle
Mass Mode
*...nachverdaut

Fragment	Masse berechnet	Masse gefunden	Spaltenzym
4-10 ^{a*}	848.5	848.5	beide
20-41 ^{a*}	2497.3	2497.3	Trypsin
27-41 ^{a*}	1655.9	1656.0	beide
59-75 ^{a*}	2203.0	2203.1	Trypsin
76-81 ^{a*}	756.3	756.3	Trypsin
82-91 ^{a*}	1122.6	1122.7	Trypsin

Tabelle 2:
Gefundene Fragmente
nach Verdau von **ABC_2**

Messungen mittels
MALDI-MS
a...im Peptide Mode
b...im Linear Middle
Mass Mode
*...nachverdaut

Fragment	Masse berechnet	Masse gefunden	Spaltenzym
1-10 ^a	1245.7	1245.7	Chymotrypsin
1-19 ^a	2222.2	2222.2	Trypsin
1-23 ^a	2683.4	2683.4	Chymotrypsin
88-99 ^a	1502.8	1502.8	Chymotrypsin
1-41 ^b	4700	4705	Trypsin
1-45 ^b	5157	5159	Trypsin
1-48 ^b	5527	5529	Trypsin
7-45 ^b	4433	4437	Trypsin
20-48 ^b	3324	3328	Trypsin
41-63 ^b	2801	2801	Chymotrypsin
42-94 ^b	6340	6344	Trypsin
76-97 ^b	2657	2661	Trypsin
4-10 ^{a*}	848.5	848.5	beide
7-12 ^{a*}	765.4	765.5	Trypsin
20-41 ^{a*}	2497.3	2497.3	Trypsin
59-75 ^{a*}	2203.0	2203.2	Trypsin

4.1.3.2. Ausschluss einer cis/trans-Isomerie am Prolin

Da das unterschiedliche chromatografische Verhalten von **ABC_1** und **ABC_2** nachweislich nicht aus einer chemischen Modifikation der Protein-Struktur beruht, kommt neben einer ursprünglich vermuteten fehlerhaften Aminosäure-Sequenz als weitere Ursache für die Bildung zweier Ligations-Produkte das Vorliegen von Isomeren in Frage

Da sich in der Sequenz vom β_2 -Mikroglobulin mehrere Proline befinden, wurde zunächst vermutet, dass es sich bei **ABC_1** und **ABC_2** um stabile cis/trans-Isomere am Prolin handelt. Es wurden RP-HPLC-Messungen bei 25 °C und 60 °C durchgeführt, da Moleküle verschiedene Retentionszeiten dann aufweisen, wenn die Relaxationszeit der Isomerisierung größer ist als die Dauer der HPLC-Trennung^[118]. Signifikante „on-Column“-Isomerisierungen können zum Beispiel durch eine geeignete Temperaturwahl unterdrückt werden.^[119] So sind bei geringen Temperaturen (-10 °C/0 °C) die stabilen Isomere deutlich sichtbar und bei hohen Temperaturen (50 °C/60 °C) kann ein einzelner,

manchmal breiter Peak erhalten werden.^{[119][120]} Dies wurde für prolinhaltige Peptide oft gezeigt.^{[118]-[120]} Bei solchen Peptiden ist das früher eluierende Molekül meist in geringerem Maße vorhanden.^[118] Dieses Molekül sollte das cis-Isomer **18** vom Prolin sein, da es auf Grund der Seitenketten-Verlinkung am α -N-Atom (Abbildung 23) weniger stabil als das trans-Isomer **19** ist.^[118] Liegt also beim ABC-Produkt-Gemisch cis-/trans-Isomerie am Prolin vor, so sollte bei 60 °C das Verhältnis der Peak-Flächen von ABC_1/ABC_2 variieren. Da aber im Vergleich zur Messung bei RT nahezu keine Veränderung des Doppelpeaks bei 60 °C zu beobachten war (Abbildung 24), ist eine solche Isomerie am Prolin nicht wahrscheinlich.

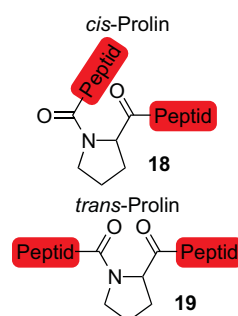


Abbildung 23:
Cis/trans-Isomerie am Prolin innerhalb eines Peptides

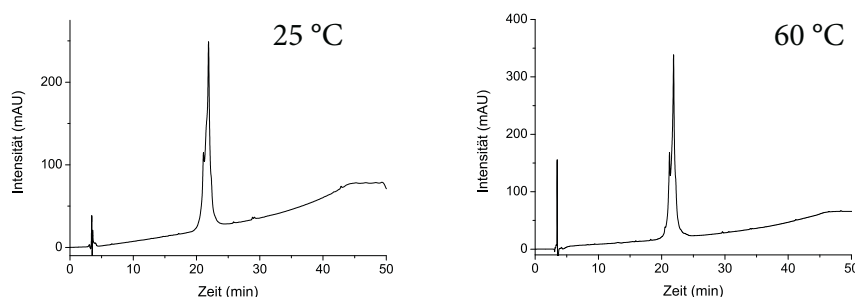


Abbildung 24:
Untersuchungen zur cis/trans-Isomerie am Prolin vom ABC-Gemisch

RP-HPLC-
Chromatogramme
(UV-Detektion: 220 nm)
vom ABC-Gemisch bei
25 °C (links) & 60 °C
(rechts)

Nach dem Ausschluss einer cis/trans-Isomerie an einem Prolin, könnten α -/ β -Isomere oder L-/D-Epimere den Unterschied zwischen den beiden ABC-Produkten ausmachen. Dieser Unterschied wäre durch MS-Analyse eines tryptischen Verdaus nicht detektierbar, es sei denn, die Isomerie betrifft enzymatische Spaltstellen und erzeugt dadurch ein verändertes Fragmentmuster. Sollten solche Isomere vorliegen, so stellt sich die Frage nach deren Ursprung. Zusätzlich zu den zwei ABC-Produkten sind bei der zweiten NCL Nebenreaktionen aufgetreten (siehe Abbildung 18), die im Folgenden detailliert untersucht wurden.

4.1.3.3. Nebenprodukt-Bildung während der NCL

Im Verlauf der NCL von A-SR und BC wurde neben der Bildung der Ligations-Produkte (ABC_1/2) und eines zu erwartenden Hydrolyse-Produktes des Thioesters (A-OH) überraschend ein Nebenprodukt

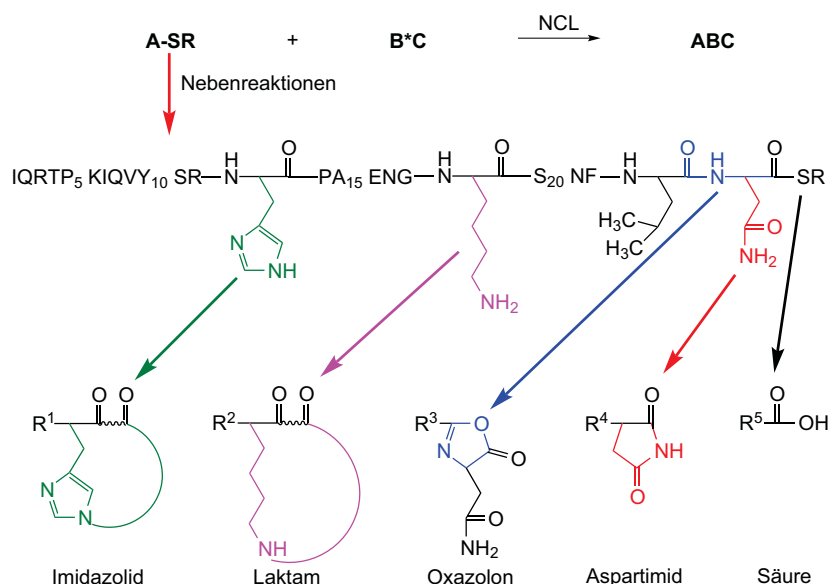
massenspektrometrisch nachgewiesen, welches eine um 18 Da verringerte Masse im Vergleich zur entsprechenden Peptidsäure A-OH aufweist (A(-18), siehe Abbildung 18).

Bereits im Rahmen von Vorarbeiten (Diplomarbeit S. Abel^[64]) wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen dem Auftreten der Nebenreaktionen und dem pH-Wert der Ligations-Lösung besteht. Dazu wurde die Stabilität vom Thioester-Segment (A-SR) unter verschiedenen pH-Werten analysiert. Diese Experimente haben ergeben, dass die Bildung des Nebenproduktes A(-18) eindeutig pH-abhängig ist, wobei ein niedrigerer pH-Wert zu weniger Nebenprodukt-Bildung führte (Tabelle 3).^[64] Mögliche Nukleophile, die pH-Wert-abhängig einen intramolekularen Angriff im A-SR eingehen können, sind die funktionellen Seitenketten-Gruppen von His₁₃ (grün), Lys₁₉ (violett)^[121], C-terminalem Asn₂₄ (rot)^[122] und der Carboxyl-Sauerstoff der benachbarten Peptid-Bindung X(C=O)-Asn₂₄ (blau)^[123] (Abbildung 25).

Tabelle 3:
pH-Abhängigkeit der Nebenprodukt-Bildung während der 2. NCL nach einer Stunde Reaktionszeit

pH	7.4	6.4	5.4
Anteil gebildeter Nebenprodukte	63 %	22 %	8 %

Abbildung 25:
Schema der gewünschten NCL und der möglichen Nebenreaktionen von A-SR



Die Seitenketten, welche einen nukleophilen Angriff ausführen können und deren resultierende Nebenprodukte, einschließlich dem Hydrolyse-Produkt, der Säure, sind gezeigt. R¹-R⁵...entsprechende AS-Sequenz bis zur fraglichen AS

Um das Nebenprodukt A(-18) der intramolekularen Zyklisierung am Thioester-Segment A-SR zu identifizieren, wurde es isoliert und anschließend über Nacht mit Trypsin in einem Puffer mit pH 8.5 verdaut. Die LC-MS-Analyse des Verdaus wies die erwarteten Fragmente von A-OH auf (Abbildung 26), aber es wurde kein Fragment mit einer

Massedifferenz von -18 Da gefunden. Dies zeigt, dass eine Hydrolyse des zyklischen Produktes unter den schwach basischen Bedingungen des tryptischen Verdaus stattfand. Interessanterweise wurden im Verdaus zwei Peptide mit identischen Massen (m/z) des entsprechenden C-terminalen Fragmentes von A-OH identifiziert ($[M+H]^+ = 594$ Da), welche Diastereomere sein können. Die Epimerisierung müsste am C-terminalen Asn aus dem intermediären zyklischen Produkt entstehen. Wegen der leichten Hydrolysierbarkeit scheidet für A(-18) eine Laktambildung über die Lysin-Seitenkettengruppe aus.

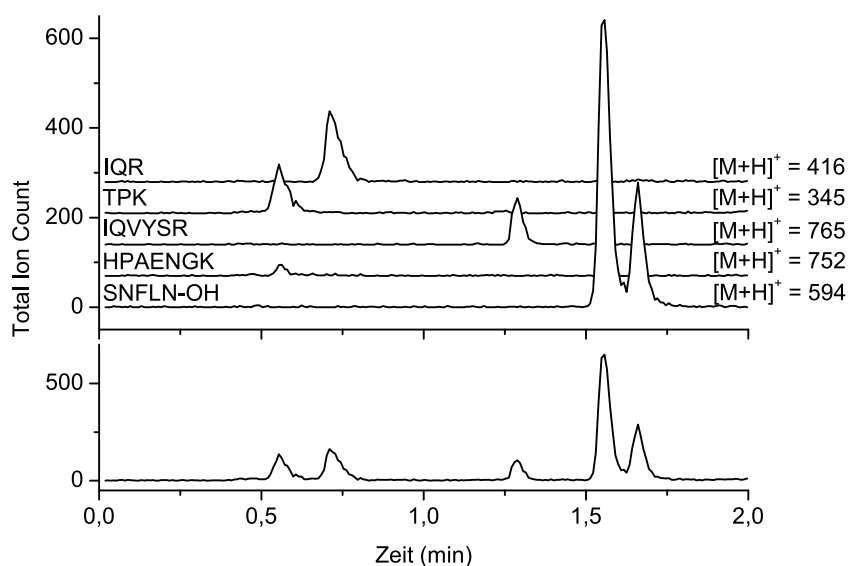


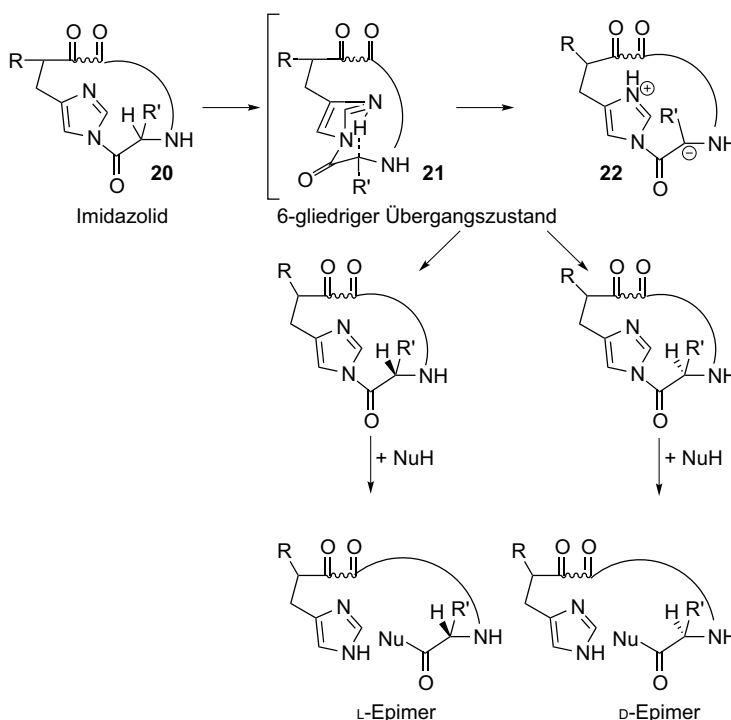
Abbildung 26:
LC-MS-Analyse des
tryptischen Verdaus von
A(-18)

Gestaffelte ESI-ToF-MS-
Spektren der partiellen
Ionen-Chromatogramme
der tryptischen
Fragmente (oberen
Chromatogramme) und
Summe der ESI-ToF-MS-
Spektren nach Verdaus
von A(-18) (unteres
Chromatogramm)

Mögliche zyklische Zwischenprodukte, die durch milde Hydrolyse ein Isomeren-Gemisch ergeben würden, sind Imidazolid und Oxazolon (L-/D-Diastereomere) sowie ein Aspartimid am C-terminalen Asparagin (α -/ β -Peptide & L-/D-Diastereomere). Der Ursprung der Isomeren-Bildung am Imidazolid **20** könnte in der räumlichen Nähe des ursprünglichen Imin-Stickstoffs liegen. Dieses könnte über einen 6-gliedrigen Übergangszustand **21** das Proton am α -Kohlenstoff-Atom abstrahieren **22** und somit zu einem Verlust der stereochemischen Reinheit führen (Abbildung 27).

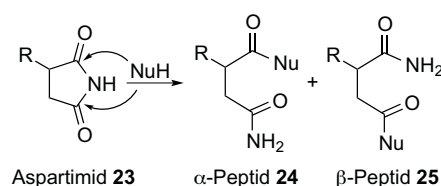
Abbildung 27:
Schema der L-/D-Epimer-
Bildung am Imidazolid

R' ... AS-Seitenkette



Aus einem intermediären Aspartimid **23** können sowohl α -/ β -Peptide als auch L-/D-Diastereomere entstehen. Die α -/ β -Peptide resultieren aus einem nukleophilen Angriff sowohl am Carbonyl-Kohlenstoff-Atom des ursprünglichen C-Terminus (α -Peptid **24**), als auch am Carbonyl-Kohlenstoff-Atom der vorhergehenden AS-Seitenkette (β -Peptid **25**, Abbildung 28). Der Verlust der optischen Reinheit kann durch die erhöhte CH-Azidität am Proton am α -Kohlenstoff-Atom wegen der benachbarten Imid-Gruppe hervorgerufen werden.

Abbildung 28:
Schema der α -/ β -
Isomeren-Bildung am
Aspartimid



R...restliches Peptid

Die „steady-state“ Konzentration des Oxazolons **26** kann dazu führen, dass eine Keto-Enol-Tautomerie **27** stattfindet, welche zu einem Verlust des stereochemischen Zentrums führt^{[124][125]} (Abbildung 29).

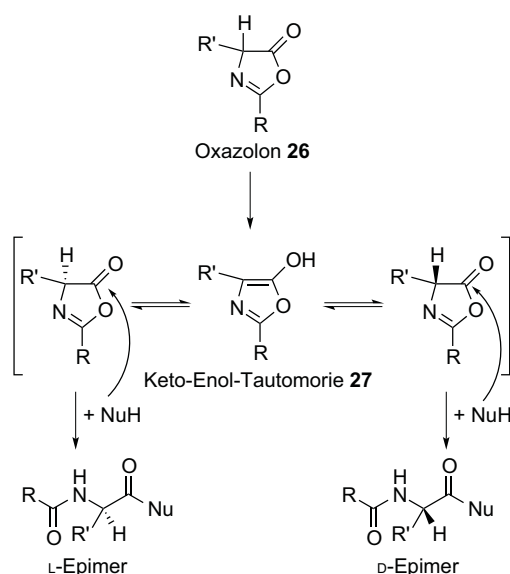


Abbildung 29:
Schema der L-/D-Epimer-
Bildung aus dem Oxazolon

R'...AS-Seitenkette,
R... restliches Peptid

Die Bildung von α/β -Isomeren kann durch die Hydrolyse von Aspartimid am C-terminalen Asn hervorgerufen werden.^[122] Um die Möglichkeit einer intermediären Aspartimid-Bildung mit solch einer nachfolgenden nukleophilen Öffnung zu untersuchen, wurde das Modell Benzoyl-LN-acetamidophenyl-Thioester (Bz-LN-SR) synthetisiert und dessen Reaktion mit Benzylamin als Nukleophil studiert. Wie vermutet, führte diese Reaktion zu zwei entsprechenden Bz-LN-benzylamiden, welche mittels RP-HPLC getrennt und LC-MS identifiziert wurden. Um zu ermitteln, ob es sich bei den beiden Bz-LN-benzylamiden um L-/D-Diastereomere oder α/β -Isomere handelt, wurden NMR-Untersuchungen durchgeführt. Eine entsprechende Auskunft sollte dem ROESY-Spektrum, also dem zwei-dimensionalen Protonen-Spektrum für Kopplungen von Kernen durch den Raum, zu entnehmen sein. Würden α/β -Isomere vorliegen, so sollte in einem der beiden Spektren für das β -Isomer die Kopplung vom

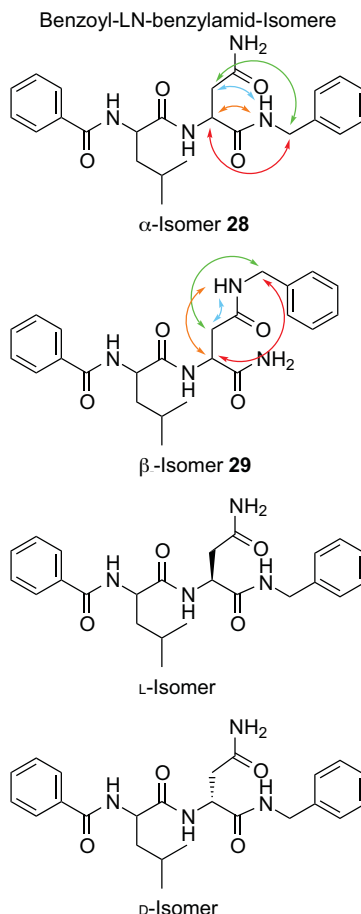


Abbildung 30:
Strukturformeln der
verschiedenen Benzoyl-
LN-benzylamid-Isomere

Kennzeichnung der zu erwartenden Protonen-Kopplungen mit dem Benzylamid-NH (orange/blau) & der Kopplungen mit den Benzylamid-CH₂-Protonen (rot/grün) im ¹H-¹H-ROESY-Spektrum für die α/β -Isomere

Benzylamid-NH und von den Benzylamid-CH _{α} -Protonen zu den Asn-CH _{β} -Protonen (blau/grün) größer sein als zum Asn-CH _{α} -Proton (orange/rot) (Abbildung 30). Für das α -Isomer **28** sind die Kopplungen vom Benzylamid-NH und von den Benzylamid-CH _{α} -Protonen zum Asn-CH _{α} -Proton entsprechend größer als zu den Asn-CH _{β} -Protonen. Da die vorliegenden Spektren (Abbildung 32 & 32), der zwei Verbindungen beide als α -Isomer **28** zu interpretieren sind, ist kein β -Isomer **29** entstanden. Zudem deutet die schwächere Benzylamid-NH-zu-Asn-CH _{α} -Kopplung (orange) vom früher eluierenden gegenüber dem später eluierenden Bz-LN-benzylamid darauf hin, dass keine sterisch identischen Verbindungen vorliegen. Die Auswertung der NMR-Daten ergibt, dass Diastereomere vorhanden sein müssen. Da keine Indikation auf die Bildung eines α -/ β -Isomers zu finden war, ist dieser Reaktionsweg über ein Aspartimid ziemlich unwahrscheinlich. Eher scheint die Bildung von Diastereomeren aus der Epimerisierung direkt aus dem reaktiven Aryl-Thioester^[126] oder über ein aus dem Thioester gebildetes Aspartimid oder Oxazolone^{[123][127]} stattzufinden. Für den direkten Weg aus dem Thioester spricht seine α -CH-Azidität, welche zu einer Razemisierung führen kann.^[121] Eine Epimerisierung über ein Aspartimid als Zwischenstufe ist wegen seiner höheren α -CH-Azidität eher denkbar. Trotzdem kann eine Epimerisierung ebenfalls aus der „steady-state“ Konzentration eines Oxazolons entstehen.^{[124][125]} Dagegen ist eine Isomerisierung zum α -/ β -Peptid-Gemisch über eine Aspartimid-Bildung aus dem Thioester während der NCL sehr unwahrscheinlich.

a)

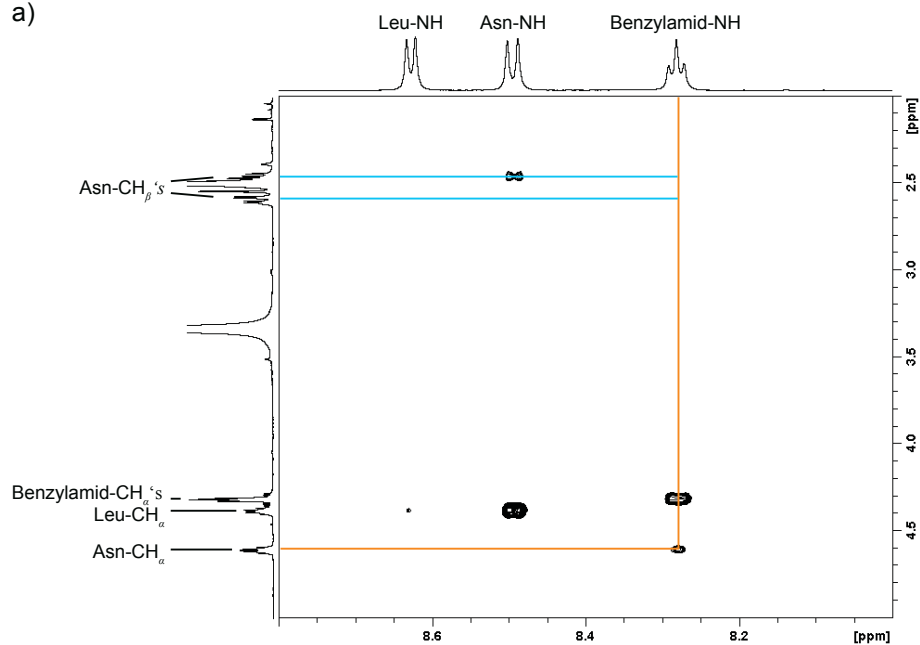


Abbildung 31:
 $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -ROESY-NMR-
Spektren (600 MHz) vom
früher eluierenden (a)
& später eluierenden
Bz-LN-Amid (b) mit
den hervorgehobenen
möglichen Kopplungen
vom Benzylamid- CH_α zum
Asn- CH_α (rot) & Asn- CH_β
(grün)

b)

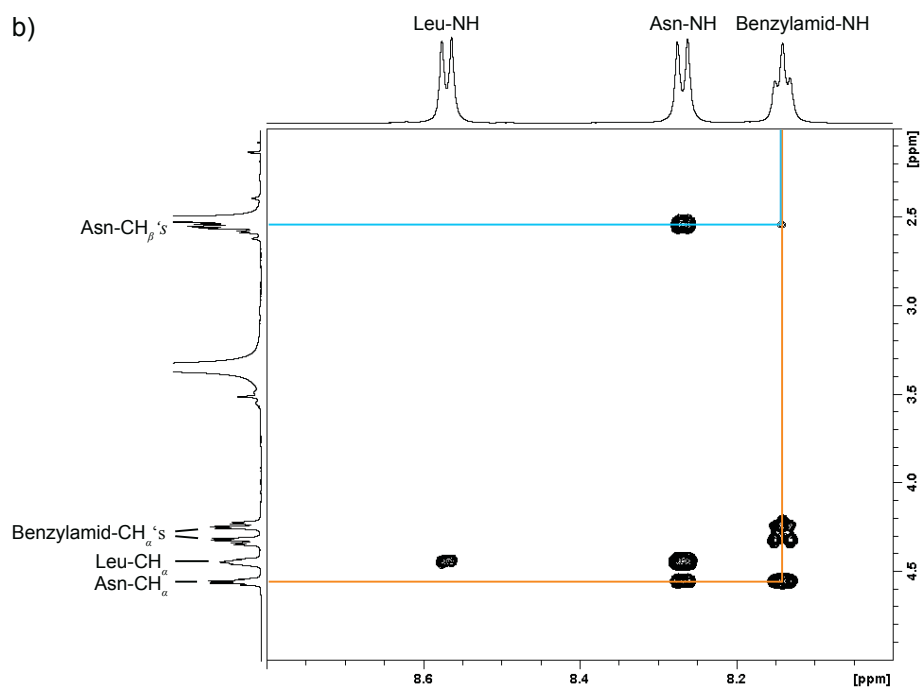
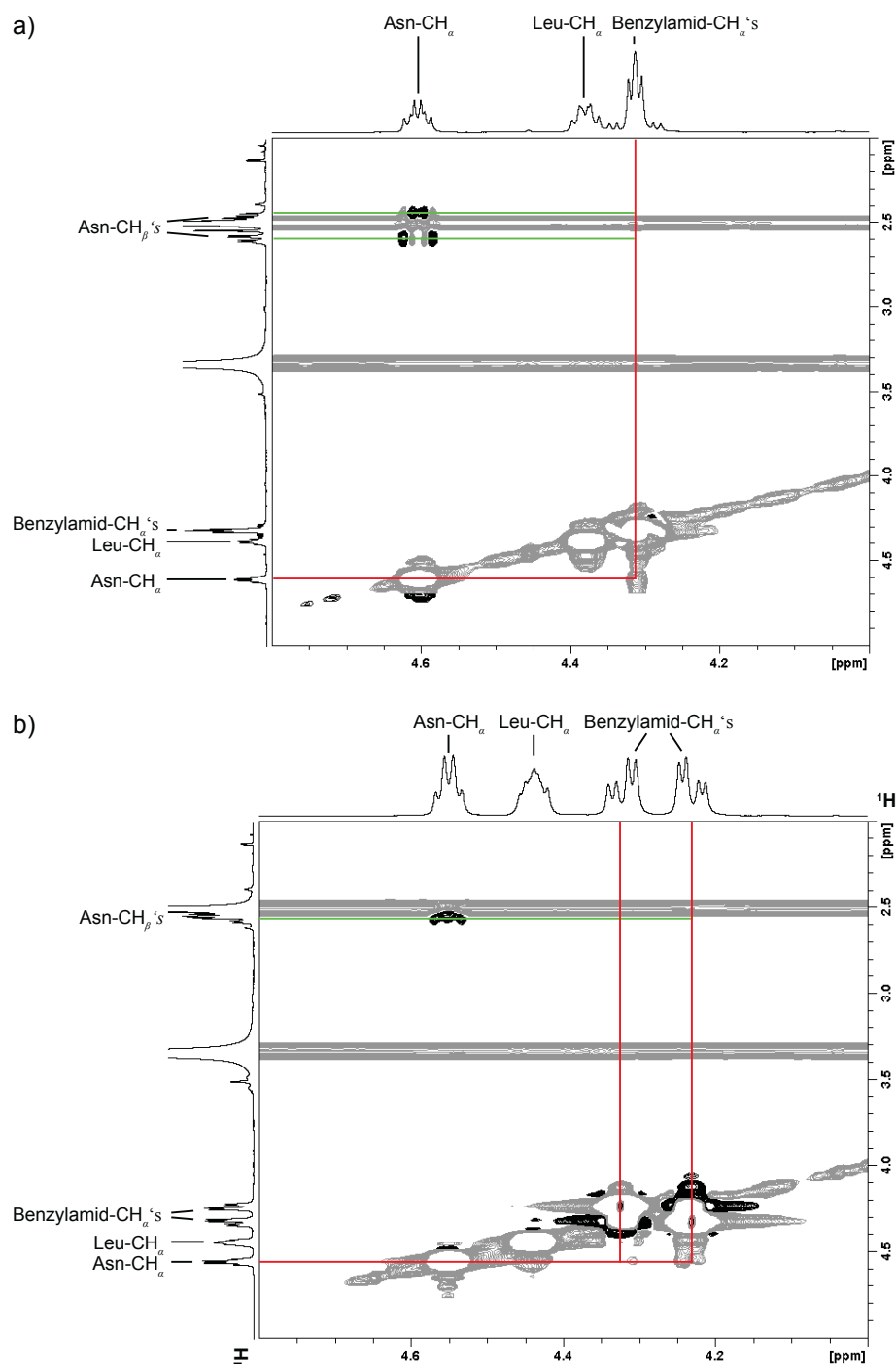


Abbildung 32:
 ^1H , ^1H -ROESY-NMR-
 Spektren (600 MHz) vom
 früher eluierenden (a)
 & später eluierenden
 Bz-LN-Amid (b) mit
 den hervorgehobenen
 möglichen Kopplungen
 vom Benzylamid-NH zum
 Asn- CH_α (orange) &
 Asn- CH_β (blau)



Um die Möglichkeit einer intramolekularen Zyklisierung über nukleophile Seitenketten-Funktionen zu untersuchen, wurden sechs Peptid-Thioester-Modelle synthetisiert und untersucht. Diese Modelle basieren auf einer verkürzten Sequenz des Segmentes **A-SR** und beinhalten einzelne oder mehrere Substitutionen durch Ala von für eine Zyklisierung in Frage kommender ASs.

(1)	Acetyl-SRHPA ENGKS NFL A -SR	M1-SR
(2)	Acetyl-SRHPA ENG A S NFLN-SR	M2-SR
(3)	Acetyl-SR A PA ENGKS NFLN-SR	M3-SR
(4)	Acetyl-SRHPA ENGKS NFLN-SR	M4-SR
(5)	Acetyl-SR A PA ENG A S NFL A -SR	M5-SR
(6)	Acetyl-SR A PA A NG A S NFL A -SR	M6-SR

Für jedes Modell wurde die Nebenprodukt-Bildung unter NCL-Bedingungen in pH-Abhängigkeit (pH 6.4, 7.4, 8.4) geprüft und ausgewählte Nebenprodukte isoliert, mit Trypsin verdaut und mit Hilfe von LC-MS und -MS/MS analysiert.

Untersuchungen per RP-HPLC und LC-MS des Modells M6-SR (schwarz), in dem alle fraglichen AS mit nukleophilen Seitenketten gegen Ala ausgetauscht sind, zeigen keine signifikante Bildung des Nebenproduktes M6(-18) (Abbildung 33), aber die Bildung zweier Peptidsäuren M6-OH. Aus der Tatsache, dass die Anwesenheit nukleophiler Gruppen in Peptid-Seitenketten zur Bildung von MX(-18) führt, ist zu schließen, dass die ausgetauschten AS auch für Zyklisierungs-Produkte von **A**(-18) am Thioester-Segment **A-SR** verantwortlich sein könnten. Dabei kann Glutaminsäure erwartungsgemäß ausgeschlossen werden, wie ein Vergleich der Ergebnisse von M5-SR (rot) und M6-SR zeigt. Dass es sich bei den Peptidsäure-Paaren für M5-OH und M6-OH um entsprechende Diastereomere handelt, die durch Epimerisierung am C-terminalen Ala entstanden sind, verdeutlicht ein chromatografischer Vergleich mit den entsprechenden Vergleichspeptiden (Abbildung 34). Diese Epimerisierung resultiert aus einem Verlust optischer Reinheit des Thioesters selbst oder/und einer intermediären Oxazolone-Bildung.

Abbildung 33:
Gegenüberstellung
der RP-HPLC-
Chromatogramme der
Nebenreaktionen der
Modelle M(1-6)-SR

Dargestellt sind von
oben nach unten die
Chromatogramme
(Detektion: 220 nm) vom
Modell M1-SR bis M6-SR
in 0.2 M Na₂HPO₄ bei
pH = 7.4 nach mehr als
24 Stunden Reaktionszeit.

(Die DIC-Aatp-Addukte
bei den Modellen M5-SR
& M6-SR entstanden
während der Thioester-
Bildung und konnten
von den Modellen
nicht getrennt werden.
Sie hatten aber auch
keinen Einfluss auf die
Untersuchungen.)

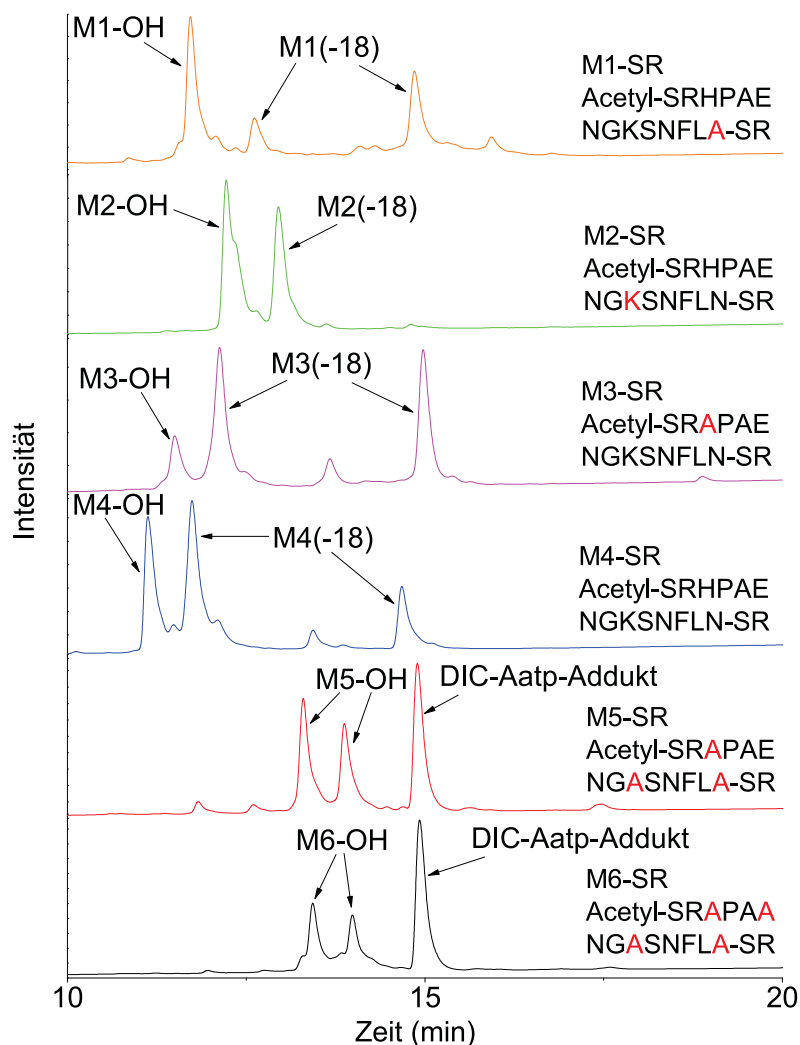
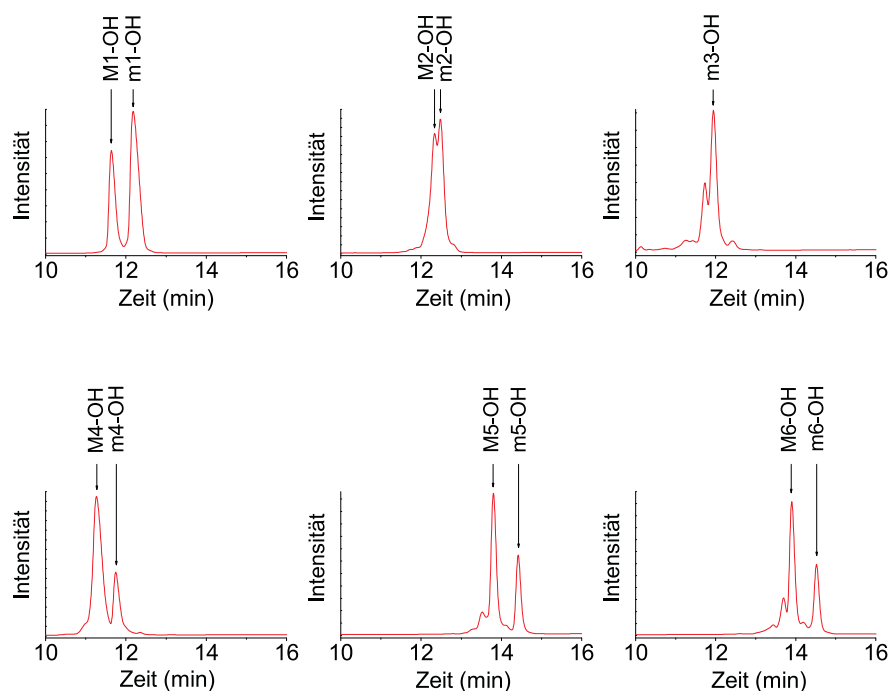


Abbildung 34:
RP-HPLC-
Chromatogramme der
co-eluierten L-/D-Säuren
der Modelle M(1-6)SR

RP-HPLC-
Chromatogramme
(Detektion: 220 nm)

M(1-6)-OH mit
C-terminalen L-AS
m(1-6)-OH mit
C-terminalen D-AS



Sind dagegen wie im Modell-Peptid-Thioester M1-SR (orange) Imidazol- oder Aminogruppen in den Seitenketten vorhanden, wird eine solche Epimerisierung nicht beobachtet (siehe Abbildung 33 & 34), weil entweder der Thioester oder das daraus gebildete Oxazon ohne oder mit wesentlich geringerer Epimerisierung mit diesen nukleophilen Gruppen reagiert. Das macht schon deutlich, dass mit Epimerisierung nur zu rechnen ist, wenn kein Nukleophil anwesend ist. Beim Vergleich der Ergebnisse für unsere Modell-Peptide können wir für MX-SR mit $X = 1, 3$ und 4 Laktam-Bildung erwarten, die für $X = 2, 5$ und 6 nicht möglich ist. Demzufolge handelt es sich bei dem MX(-18)-Produkt mit höherer Retention (ca. $t_R = 15$ min in Abbildung 33) wahrscheinlich um das gebildete Laktam. Um dies zu beweisen, wurden speziell diese MX(-18)-Fraktionen (M1(-18) & M3(-18)) mittels RP-HPLC isoliert, mit Trypsin verdaut und per LC-MS analysiert (Abbildung 35). Im Kontrast zum tryptischen Verdau des β_2 -M-Segmentes A-SR (siehe Abbildung 26) wurde hier ein (-18) Hauptfragment an der Lys-Position nicht gespalten ($[M+2H]^{2+} = 634$ Da). Dies deutet auf eine intramolekulare Zyklisierung am Lys unter der Bildung von Laktam hin, da diese Modifikation vom Trypsin nicht erkannt und gespalten werden kann. Zusätzlich zum tryptischen Verdau wurde das isolierte Nebenprodukt per MS/MS vermessen (Abbildung 36). Die Auswertung macht deutlich, dass die b-Fragmente bis zur AS Asn₇ genauso wie die y-Fragmente des angenommenen Laktams bis zur AS His₃ dominieren, was die Position der AS-Seitenkette, welche eine interne Zyklisierung eingehen kann auf das Lys eingrenzt. Insgesamt bestätigen die Resultate die Bildung von Laktam für das später eluierende Nebenprodukt MX(-18).

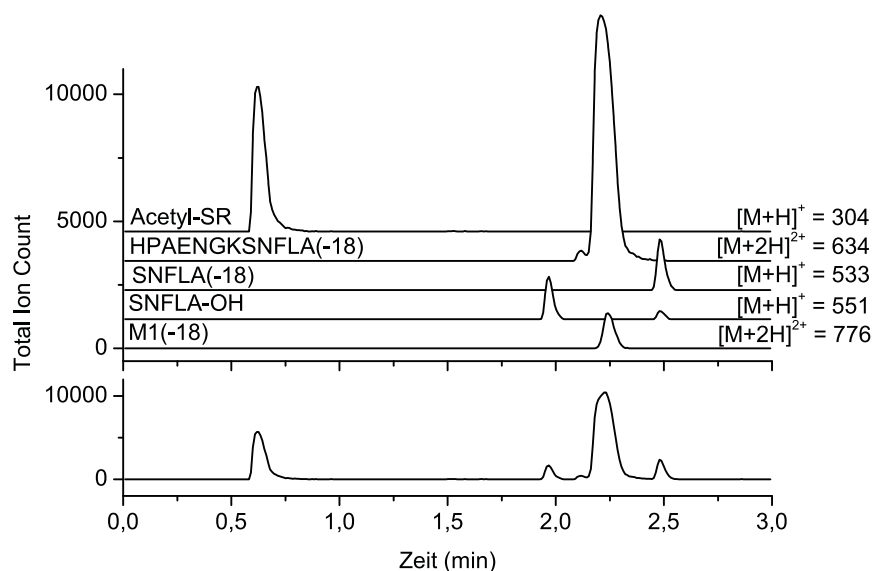
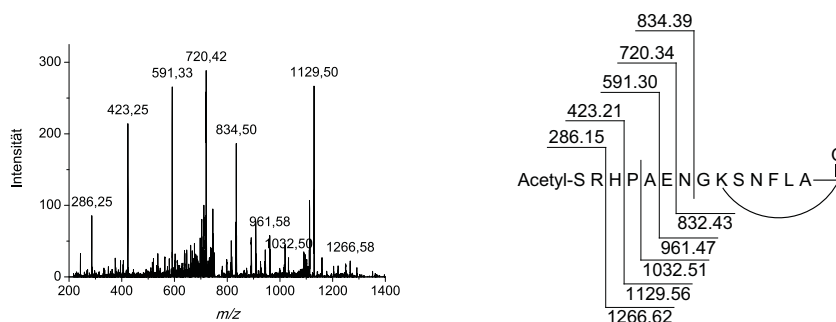


Abbildung 35:
LC-MS-Analyse des
tryptischen Verdau
vom später eluierenden
M1(-18), dem
vermutlichen Laktam

Gestaffelte ESI-ToF-MS-
Spektren der partiellen
Ionen-Chromatogramme
der tryptischen
Fragmente (oberen
Chromatogramme) und
Summe der ESI-ToF-MS-
Spektren nach Verdau
von M1(-18) (unteres
Chromatogramm)

Abbildung 36:
MS/MS-Spektrum vom
später eluierenden
M1(-18), dem vermuteten
Laktam

Spektrum vom $[M+2H]^{2+}$ -
Ion vom Laktam
und seinen b- und
y-Fragmenten mit den
dazugehörigen Massen



Interessanterweise bildet auch M2-SR ein M2(-18)-Produkt. Dieses Produkt sollte kein Oxazolone sein, weil ein Oxazolone wie im Fall von M6-SR hydrolysiert werden würde. Möglicherweise bildet sich ein zyklisches Imidazolid. Das ist insofern überraschend, weil auch M3-SR ein zweites M3(-18)-Produkt bildet, obwohl es kein Imidazolid bilden kann, also lediglich eine Laktam-Bildung zeigen sollte. Denkbar wäre hier aber, dass die Bildung eines Aspartimids zu dem zweiten M3(-18)-Produkt führt. Bei Annahme einer Aspartimid-Bildung für M3-SR sollte man ein Aspartimid auch für M2-SR finden. Das kann nicht ausgeschlossen werden, wenn Aspartimid und Imidazolid eine gleiche Retention in der RP-HPLC zeigen. Ein Aspartimid kann nun wiederum nicht von M1-SR gebildet werden. Aber auch M1-SR bildet zwei M1(-18)-Produkte, wobei es sich beim früher eluierenden Peak um Imidazolid handeln könnte. Die entsprechenden Fraktionen M1(-18) und M3(-18) mit geringerer Retention wurden mittels präparativer RP-HPLC isoliert, mit Trypsin verdaut und mittels LC-MS analysiert. In Analogie zum β_2 -M-Segment A-SR weisen beide Verdaue keine tryptischen Fehlsplattstellen auf, führen aber ebenfalls zu zwei C-terminalen Fragmenten (SNFLX-OH, Abbildung 37), die eine Epimerisierung belegen. In allen Fällen ist eine Ringöffnung durch die basischen Bedingungen des tryptischen Verdaus erfolgt, wobei hier offen bleiben muss, welche Anteile Imidazolid- und Aspartimid-Bildung dabei haben. Es wird aber aus dem Vergleich der Ergebnisse für M1-SR und M4-SR deutlich, dass der C-terminale Ala-Asn-Tausch einen erheblichen Effekt auf die Bildung des MX(-18)-Produktes mit geringerer Retention hat (siehe Abbildung 33 & 34), was auf Aspartimid-Bildung für M4-SR schließen lässt.

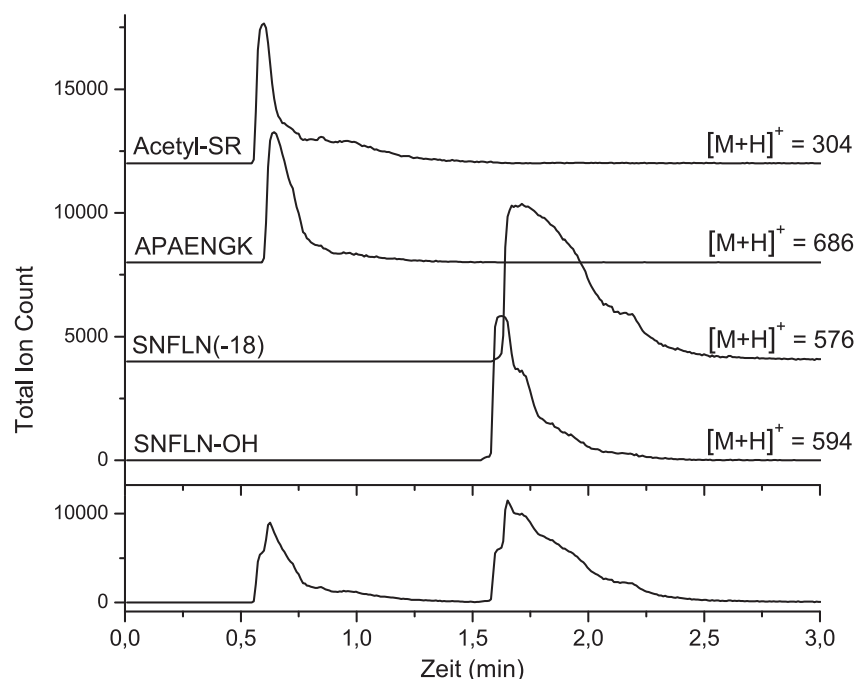


Abbildung 37:
LC-MS-Analyse des
tryptischen Verdaus
vom früher eluierenden
M3(-18)

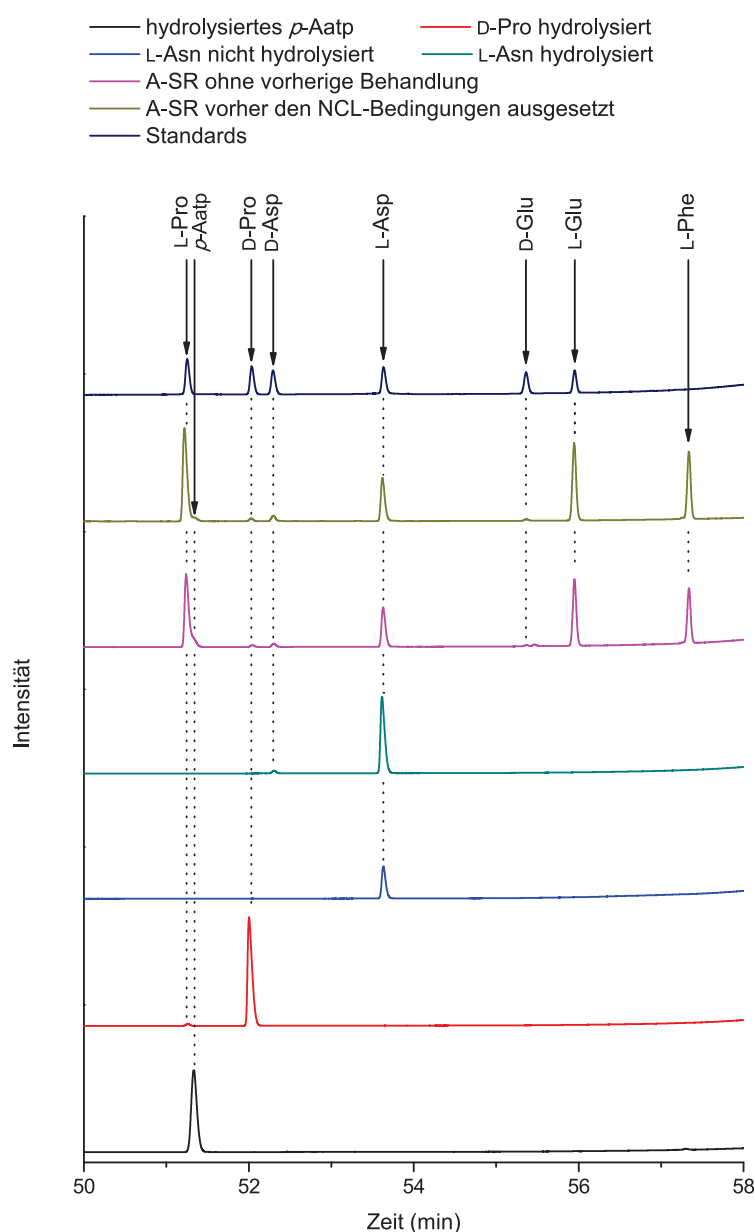
Gestaffelte ESI-ToF-MS-
Spektren der partiellen
Ionen-Chromatogramme
der tryptischen
Fragmente (oberen
Chromatogramme) und
Summe der ESI-ToF-MS-
Spektren nach Verdau
von M3(-18) (unteres
Chromatogramm)

Für eine NCL ist die Laktam-Bildung ohne Folgen, wenn man den Verlust an Thioesterkomponente außer Acht lässt. Die Aspartimid-Bildung hätte die Konsequenz einer potenziellen Epimerisierung und α -/ β -Peptid-Bildung. Wie für die Aminolyse von Bz-LN-SR oben gezeigt wurde, sollte die α -/ β -Peptid-Bildung für eine NCL vernachlässigbar sein. Imidazolid-Bildung könnte aber wie Oxazolon-Bildung in einer Epimerisierung resultieren, deren Ausmaß bestimmt werden muss.

So wurden Untersuchungen hinsichtlich der Epimerisierung des Peptid-Thioesters vom β_2 -M-Segment **A-SR** mittels gaschromatografischer (GC)-Analyse durchgeführt (Abbildung 38). Dieses Verfahren ist ein Standard-Verfahren zur Ermittlung der L- und D-Isomere von AS.^{[128]-[130]} Während der sauren Hydrolyse und Derivatisierung werden unter den vorherrschenden Bedingungen dieses Verfahrens Asn und Gln in Asp und Glu umgewandelt. Da die AS-Sequenz von **A-SR** kein Asp aufweist, muss dies hier nicht berücksichtigt werden. Zunächst wurde die durch die Derivatisierung bedingte Isomerisierung^[131] von freiem Asn untersucht (grün) und zu 3 % bestimmt. Im zweiten Versuch wurde der Thioester **A-SR** sauer hydrolysiert (pink) und die Analyse ergab, dass für diesen Thioester 6 % Isomerisierung gefunden wurden, da ein Anteil von 9 % an D-Asn bestimmt wurde. Wird der Peptid-Thioester den Bedingungen der NCL für eine Stunde unterworfen, zeigte die anschließende Analyse (oliv) eine Erhöhung des Anteils an D-Asn auf 12 %. Diese Untersuchung macht deutlich, dass bei der NCL dieses Peptid-Thioesters deutliche

Epimerisierung im Bereich von 6 % nicht auszuschließen ist, auch wenn man die Bedingungen ohne ein Cystein-Peptid als Ligations-Partner einer Ligation nicht gleichsetzen darf. Gleichzeitig zeigt dieses Ergebnis, dass selbst bei Bildung von intermediären Cyclopeptid-Produkten wie im Beispiel der M(1-6)-Peptide gezeigt, eine Epimerisierung maximal 6 % erreichen sollte

Abbildung 38:
GC-FID-
Chromatogramme
(Lipodex E) der
Stereoisomerie-
Untersuchungen der
einzelnen AS von A-SR



4.1.3.4. Epimerisierung von Asn₂₄ in der NCL

Die soweit erhaltenen Hinweise auf verschiedene Nebenprodukte bei der NCL, die zu einer Epimerisierung der C-terminalen Aminosäure des Peptid-Thioesters führen können, erforderten eine entsprechende

Analyse, um zu prüfen, ob eine Ursache für die Entstehung von zwei massenspektrometrisch identischen, linearen β_2 -M-Produkten, **ABC_1** und **ABC_2**, im Verlust der optischen Reinheit von Asn_{24} bestehen könnte. Dazu wurde das Protein enzymatisch so gespalten, dass ein kurzes Peptid-Fragment mit Asn_{24} entsteht, das hinsichtlich seiner optischen Integrität analysiert werden konnte

Ein Trypsin-Verdau erwies sich als ungünstig, da das entstehende Fragment 20-41 zu einem ziemlich großen ist und zum anderen per LC-MS nicht detektiert werden konnte. Daher wurde ein Chymotrypsin-Verdau des **ABC_1/2**-Gemisches durchgeführt, wobei das fragliche Asn_{24} in dem Fragment LNCY_{23-26} vorkommt. Um einen Vergleich bezüglich der Retentionszeiten der L- bzw. D-Diastereomere ziehen zu können, wurden entsprechende Peptide synthetisiert. Zum Vergleich mit dem chymotryptisch verdauten **ABC**-Gemisch (rot) wurden die Segmente $\text{LNCY}:\text{LnCY}$ in einem Verhältnis von 8:1 co-eluiert (schwarz). Da nahezu kein Fragment mit einem D-Asn in dem verdauten Gemisch nachweisbar war (Abbildung 39), sollte hier ausgeschlossen werden können, dass die beiden erhaltenen **ABC**-Produkte Diastereomere repräsentieren. Nichtsdestotrotz kann nicht abgeschätzt werden, welchen Einfluss eine D-AS in Nachbarschaft zur Spaltstelle auf den Verdau und entsprechende Bildung von Fragmenten hat.

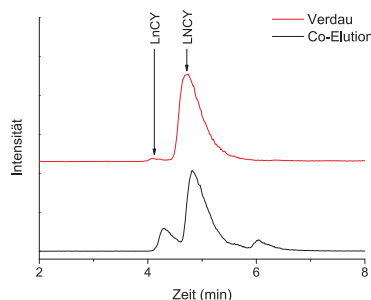


Abbildung 39:
LC-MS-Analyse vom
Chymotrypsin-Verdau
vom **ABC**-Produkt-
Gemisch (oben/rot)
und den co-eluierten
synthetisierten $\text{LNCY}/$
 LnCY -Segmenten

ESI-ToF-MS-Spektren
der partiellen Ionen-
Chromatogramme vom
chymotryptischen Verdau
vom **ABC**-Gemisch und
von der Co-Elution der
synthetisierten Fragmente
 $\text{LNCY}:\text{LnCY}$ im
Verhältnis 8:1

Dieses Ergebnis widerlegt die Vermutung, dass **ABC_1** und **ABC_2** unterschiedliche Strukturen auf Grund einer verschiedenen Konfiguration von Asn_{24} ausbilden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass schon ein sehr geringer, weil nicht vollständig abtrennbarer Anteil, eines diastereomeren Proteins bewirkt, dass sich die dem rekombinanten Protein entsprechende Struktur für die **ABC**-Produkte nicht bilden kann.

Zusammengefasst verdeutlichen die dargelegten Ergebnisse, dass für den Acetamidophenyl-Thioester von Peptiden selbst bei einer sehr langsam verlaufenden Ligation mit Cys-Peptiden, wie der Kupplung von **A-SR** mit **BC**, die intermediäre Bildung von Imidazolid, Imid und Oxazolon nicht ausgeschlossen werden kann, selbst wenn die Bildung eines Laktams hier nicht beobachtet wurde. Die nachweisbare Epimerisierung

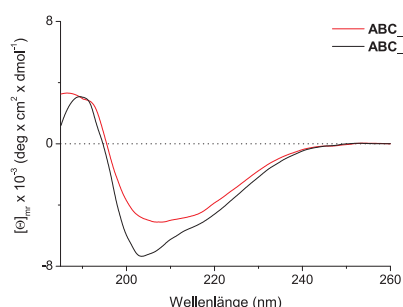
für Asn_{24} im Produkt-Gemisch der Ligation kann jedoch vernachlässigt werden, womit das Entstehen zweier linearer β_2 -Mikroglobuline nicht auf verschiedene Isomere zurückgeführt werden kann. Infolgedessen sollte untersucht werden, ob der Unterschied zwischen **ABC_1** und **ABC_2** durch differierende Sekundär-Strukturen hervorgerufen wird.

4.1.3.5. Unterschiede in der Sekundär-Struktur

Für Untersuchungen der Sekundär-Struktur der beiden linearen Ligations-Produkte **ABC_1** und **ABC_2** wurden die hierfür üblichen Messverfahren die Zirculardichroismus- (CD)-Spektroskopie und der Fouriertransformations-IR- (FTIR)-Spektroskopie genutzt.

Sowohl für **ABC_1** (rot) als auch für **ABC_2** (schwarz) weisen die CD-Spektren Charakteristika von β -Faltblatt-Strukturen auf (Abbildung 40).^{[132]-[134]} Sie

Abbildung 40:
CD-Spektren von **ABC_1**
(rot) & **ABC_2** (schwarz)



haben eine negative Bande bei 210-220 nm und eine positive Bande bei 190-200 nm.^{[132][133]} Jedoch zeigen die CD-Spektren deutliche Unterschiede auf, was bedeutet, dass sich die β -Faltblatt-

Strukturen der beiden **ABC**-Produkte signifikant unterscheiden, ohne dass hier eine Quantifizierung der Unterschiede erfolgen kann.

Ein analoges Ergebnis erbrachten FTIR-spektroskopische Messungen beider Proteine, die eindeutig als β -Faltblatt-Strukturen identifiziert wurden. Im Bereich $1620\text{-}1635\text{ cm}^{-1}$, welcher für β -Faltblatt-Strukturen charakteristische Banden zeigt, sind wiederum signifikante Unterschiede für **ABC_1** (grün) und **ABC_2** (rot) zu erkennen (Abbildung 41). Hier sind zwar die Banden für antiparallele β -Faltblatt-Strukturen vorhanden^{[76]-[78][133]}, aber für **ABC_1** liegt die starke Bande bei 1626 cm^{-1} und für **ABC_2** bei 1630 cm^{-1} . Des Weiteren befindet sich die schwache Bande von **ABC_1** bei 1683 cm^{-1} und von **ABC_2** bei 1681 cm^{-1} . Es sind also Unterschiede innerhalb der jeweils vorhandenen antiparallelen β -Faltblatt-Strukturen von **ABC_1** und **ABC_2** zu erkennen. Darüber hinaus war keines der beiden chemosynthetischen

Produkte identisch mit dem rekombinanten β_2 -Mikroglobulin (schwarz), dessen charakteristische Banden für die antiparallele β -Faltblatt-Struktur bei 1633 cm^{-1} bzw. 1682 cm^{-1} liegen.

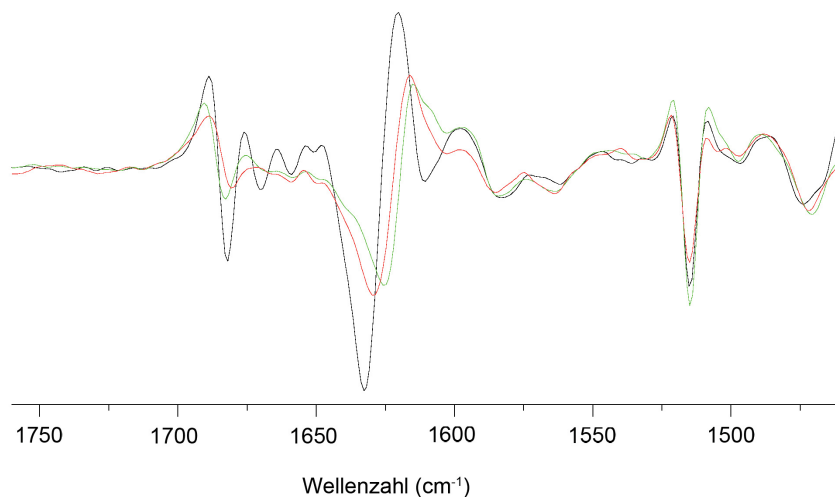


Abbildung 41:
FTIR-Spektren vom
ABC_1 (grün),
ABC_2 (rot),
rek. β_2 -M (schwarz)

Die Ergebnisse der spektroskopischen Analysen belegen eindeutig, dass **ABC_1** und **ABC_2** unterschiedliche β -Faltblatt-Strukturen bilden, die das abweichende chromatografische Verhalten der beiden Ligations-Produkte erklären können. Sie liefern jedoch keinen Hinweis auf die Ursache der verschiedenen Sekundär-Strukturen. Dies bedeutet jedoch auch, dass nicht das gesuchte Produkt und dessen Konfigurations-Isomer vorliegen können, denn dann müsste eines der beiden **ABC**-Produkte das gewünschte lineare β_2 -Mikroglobulin sein und sich somit analog dem rekombinanten β_2 -M verhalten. Das andere **ABC**-Produkt müsste dann das entsprechende Isomer sein und demzufolge andere Eigenschaften aufweisen. Da aber keines der beiden Ligations-Produkte eine zum rekombinanten β_2 -Mikroglobulin kongruente Struktur aufweist, ist das Vorliegen eines solchen Isomeren-Gemisches zuverlässig auszuschließen. Um letztlich eine Faltung der synthetischen **ABC**-Produkte mit der Struktur des rekombinanten β_2 -M herbeizuführen, sollte es von Vorteil sein, von einer ungefalteten Form auszugehen. Daher wurden Bedingungen für eine Denaturierung der beiden **ABC**-Produkte untersucht.

4.1.3.6. Denaturierung der linearen β_2 -M-Produkte

Um die unterschiedlichen Sekundär-Strukturen von **ABC_1** und **ABC_2** aufzubrechen, wurde das Gemisch denaturierenden Bedingungen ausgesetzt. D. h., dass vorherrschende Kräfte zwischen verschiedenen Bereichen, welche die Strukturen zusammenhalten, gestört werden sollten. Hier sollte eine chemische Denaturierung mittels verschiedener Lösungsmittel geschehen. Zum einen sollte ermittelt werden, ob pH-Änderungen der Lösung einen Einfluss haben und zum anderen sollte der Effekt unterschiedlicher Denaturierungsmittel wie Guanidin•HCl, Harnstoff, Hexafluorisopropanol (HFIP) und TFA studiert werden. Es sollte also untersucht werden, ob in Abhängigkeit des pH-Wertes und der damit einhergehenden Ladungsverschiebung im Protein eine Konformations-Änderung zu beobachten ist. Hierfür wurde das **ABC**-Gemisch drei verschiedenen pH-Werten (<2, 5, >9) ausgesetzt. Im sauren Milieu ist ein Überschuss an Protonen vorhanden, was zu einer Anlagerung dieser an der Carboxylgruppe führt. Dies hat zur Folge, dass im Protein vorhandene negative Ladungen eliminiert werden und somit keine ionischen Wechselwirkungen zwischen den Carboxylgruppen und den positiven Ladungen im Protein mehr möglich sind. Zusätzlich werden vereinzelt Wasserstoff-Brücken-Bindungen gestört. Genauso wie im Sauren liegt bei einem basischen Milieu eine andere Ionen-Zusammensetzung vor. Hier ist die Aminogruppe von Lysin und die Carboxylgruppe deprotoniert, was zu einer höheren negativen Ladung innerhalb des Proteins führt. Sind also die verschiedenen Strukturen von **ABC_1** und **ABC_2** auf unterschiedliche ionische Wechselwirkungen oder Wasserstoff-Brücken-Bindungen zurückzuführen, dann sollte unter einem der drei pH-Werte die Struktur aufgebrochen werden. Nach kurzer Verweildauer (1-3 h) des **ABC**-Gemisches erfolgte lediglich im Basischen (grün) ein minimaler Shift in den RP-HPLC-Chromatogrammen in Richtung des **ABC_1** (Abbildung 42a). Nachdem das **ABC**-Gemisch den verschiedenen pH-Werten längere Zeit ausgesetzt war (über Nacht), bestätigte sich der Shift in der RP-HPLC vom **ABC_2** zum **ABC_1** für pH >9 (Abbildung 42b). Eine Detektion im ultravioletten (UV) Bereich des **ABC**-Gemisches, welches den beiden anderen pH-Wert ausgesetzt war, konnte auf Grund von Niederschlags-Bildung, die vermutlich aus oxidativer inter- und intramolekularer Disulfid-Bildung, Aggregation und Fibrillen-Bildung resultierte, nicht erzielt werden. Um auszuschließen, dass die Veränderung im Basischen auf Rückstände von Metall-Ionen in der basischen Lösung zurückzuführen sind, wurden anschließend diese unter Zuhilfenahme von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) ausgeschlossen. Metall-Ionen können durch die Ausbildung koordinativer Bindungen zu den Seitenketten von zum Beispiel His und Lys Strukturen innerhalb von Proteinen induzieren. In Anwesenheit von EDTA würden eventuell vorhandene Metall-Ionen von diesem komplexiert und somit mögliche koordinative Bindungen im Protein gestört werden. Da die Verwendung von EDTA kein Einfluss auf das chromatografische Verhalten des **ABC**-Gemisches hatte (nicht gezeigt), sind koordinative Bindungen über Metall-Ionen als Ursache für eine induzierte Struktur-Bildung auszuschließen.

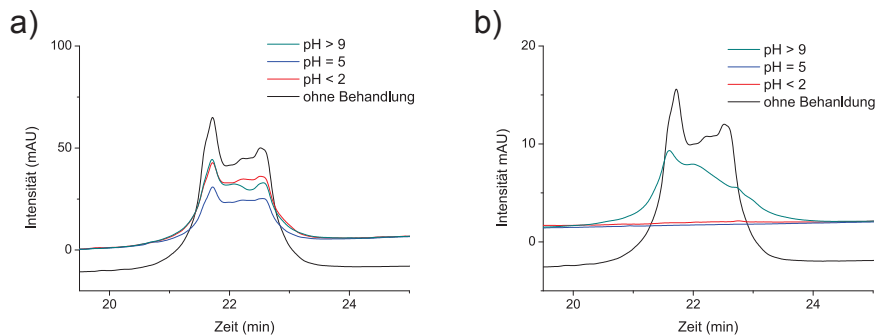


Abbildung 42:
pH-Untersuchungen vom
ABC-Produkt-Gemisch

RP-HPLC-
Chromatogramme
(Detektion: 220 nm)
des ABC-Gemisches in
verschiedenen pH-Werten
a) nach 1-3 Stunden,
b) nach Behandlung über
Nacht

Um mögliche hydrophobe Wechselwirkungen auszuschließen, wurde das ABC-Gemisch dem Denaturierungsmittel Guanidin•HCl und Harnstoff ausgesetzt. Unter diesen Bedingungen würden beide Sekundär-Strukturen in eine denaturierte Struktur übergehen, was sich in einem veränderten Chromatogramm der RP-HPLC zeigen sollte. Da weder Gn•HCl noch Harnstoff einen Einfluss auf das chromatografische Verhalten des ABC-Gemisches hatten (Abbildung 43a, b), sind diese Wechselwirkungen als Ursache für verschiedene Strukturen auszuschließen. Um eine Störung der Sekundär-Struktur sicherzustellen, wurde das ABC-Gemisch in HFIP bzw. TFA aufgenommen. HFIP und TFA bilden Wasserstoff-Brücken-Bindungen aus und stören somit solche Wechselwirkungen innerhalb eines Proteins. Beide sind zusätzlich in der Lage, hydrophobe Interaktionen einzugehen und dadurch Protein-Strukturen zu zerstören. Doch beide Denaturierungsmittel hatten keine Auswirkung auf die chromatografischen Eigenschaften des ABC-Gemisches (Abbildung 43c, d). Auf Grund der schlechten Löslichkeit in HFIP ist die Aussagekraft dieses Ansatzes zwar limitiert, aber es lassen sich prinzipiell aus diesen Denaturierungs-Untersuchungen keine Rückschlüsse auf den Ursprung der strukturellen Unterschiede zwischen ABC_1 und ABC_2 finden.

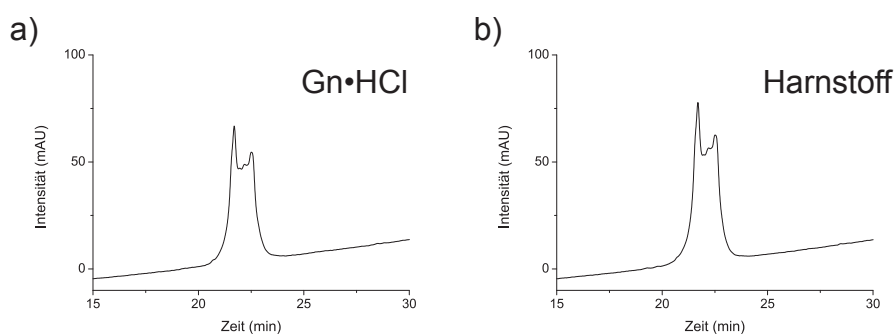
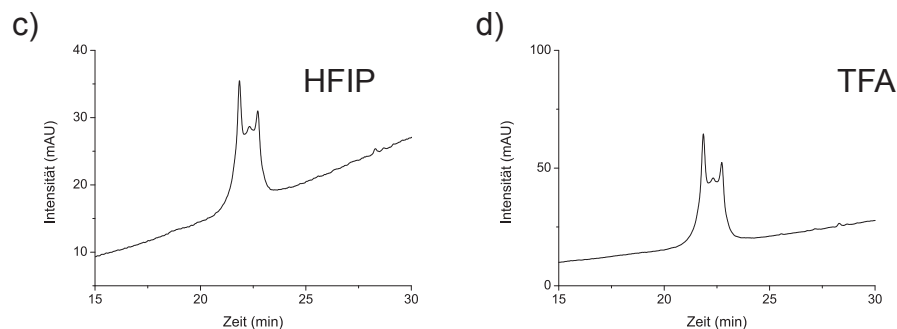


Abbildung 43:
Lösungs-Versuche
vom ABC-Gemisch
unter denaturierenden
Bedingungen

RP-HPLC-
Chromatogramme
(UV-Detektion: 220 nm)
a) in Gn•HCl,
b) in Harnstoff,

Auf der folgenden Seite...

c) in HFIP,
d) in TFA



Die Ergebnisse der spektroskopischen Analysen belegen eindeutig, dass **ABC_1** und **ABC_2** unterschiedliche β -Faltblatt-Strukturen bilden, die das abweichende chromatografische Verhalten von **ABC_1** und **ABC_2** erklären können. Sie liefern jedoch keinen Hinweis auf die Ursache dafür. Die Beobachtung, dass weder drastische pH-Änderungen der wässrigen Lösungen von **ABC_1** und **ABC_2** noch der Zusatz verschiedener Denaturierungsmittel einen Einfluss auf das chromatografische Verhalten der Proteine haben, könnte dadurch erklärbar sein, dass die Ausbildung dieser Faltblatt-Strukturen sehr schnell erfolgt, vielleicht sogar an hydrophober Phase bei der analytischen RP-HPLC, so dass denaturierte Zustände nach Auftragen auf die RP-HPLC und Abtrennen des denaturierenden Milieus spontan auf der Säule wieder falten. Um diese Frage zu beantworten, wurden wiederum FTIR-spektroskopische Untersuchungen unter entsprechenden Bedingung durchgeführt. Zum einen wurden thermische Denaturierungs-Bedingungen gewählt und zum anderen wurden die Proteine in deuteriertem Lösungsmittel einem pD-Wert von 2.4 ausgesetzt. Diese Versuchen fanden exemplarisch am **ABC_1** statt.

Als erstes wurde das Verhalten in deuteriertem 10 mM Natrium-Cacodylat-Puffer bei einem pD-Wert von 7 unter Zufuhr thermischer Energie in Relation zum rekombinanten β_2 -Mikroglobulin gesetzt (Abbildung). Bei beiden Proteinen ist bei 65 °C (rot) die Intensität der charakteristischen Banden für die antiparallele β -Faltblatt-Struktur ($\approx 1630\text{ cm}^{-1}$ & $\approx 1682\text{ cm}^{-1}$) geringer und somit wahrscheinlich schon gelockert. Auffällig ist jedoch, dass das rekombinante β_2 -Mikroglobulin bei 85 °C (schwarz) eine breite Bande bei 1639 cm^{-1} aufzeigt (Abbildung a). Dies ist typisch für eine komplett bzw. hauptsächlich ungeordnete Struktur.^[78] Dahingegen weist das synthetische Protein bei dieser Temperatur neben der breiten Bande immer noch die Banden für die β -Faltblatt-Struktur auf (Abbildung b). D. h., dass die vom

synthetischen Produkt eingenommene Struktur wesentlich stabiler ist, als die des rekombinanten β_2 -M und nicht so leicht thermisch denaturiert werden kann.

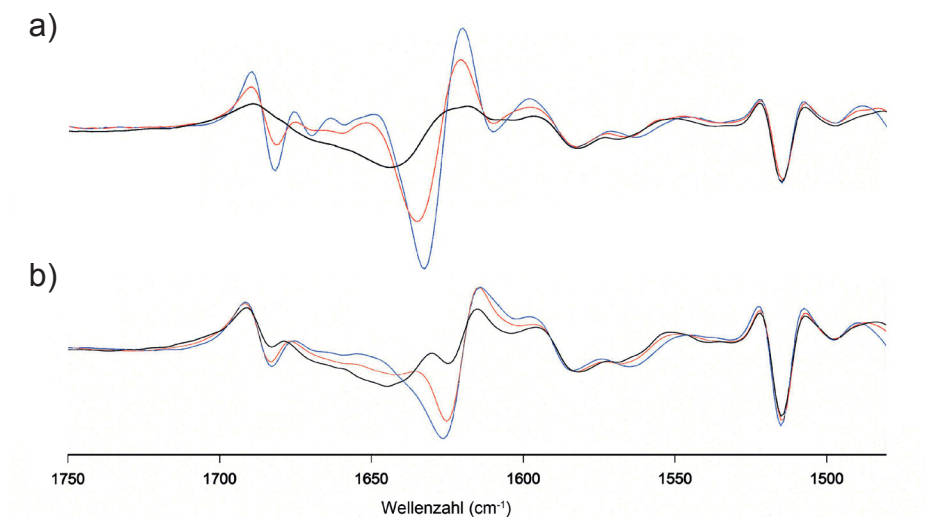


Abbildung 44:
Untersuchungen
der thermischen
Denaturierung mittels
FTIR-Spektroskopie

a) rekombinantes β_2 -M,
b) **ABC_1**,

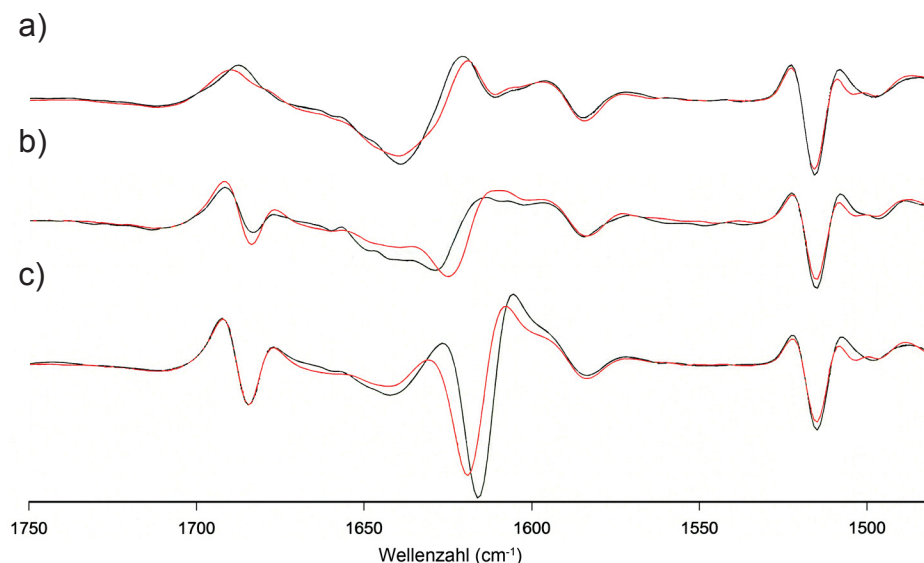
bei 20 °C (blau), 65 °C
(rot) & 85 °C (schwarz)
in 10 mM Natrium-
Cacodylat-Puffer bei pD 7

Nach den thermischen Untersuchungen wurden die beiden Proteine (rekombinantes β_2 -M & **ABC_1**) in DCl bei einem pD-Wert von 2.4 aufgenommen und nach vollständigem H/D-Austausch vermessen (Abbildung 45a). Im Gegensatz zur thermischen Denaturierung ist die Struktur des **ABC_1** (rot) hier weitgehend ungeordnet, was durch die breite Bande um 1639 cm^{-1} deutlich wird. Allerdings weisen die schwachen Schultern um 1630 cm^{-1} und 1682 cm^{-1} darauf hin, dass teilweise noch immer eine β -Faltblatt-Struktur vorliegt. Dies bestätigt, dass die Struktur des synthetischen Produktes nur schwer aufzubrechen ist. Ausgehend von der annähernd ungeordneten Form wurde anschließend durch Zugabe von 0.2 M NaCl das Aggregations-Verhalten der beiden Proteine studiert. Nach kurzer Zeit (3 min, Abbildung 45b) zeigt das lineare synthetische **ABC_1** eine schnellere und zudem andere Faltung gegenüber dem rekombinanten β_2 -M (grün). Es sind für das synthetische Protein die Banden bei 1625 cm^{-1} und 1684 cm^{-1} viel deutlicher ausgeprägt, als die des rekombinanten, welche zu dem bei 1629 cm^{-1} und 1684 cm^{-1} liegen. Bei beiden werden zunächst, wenn auch unterschiedliche antiparallele β -Faltblatt-Strukturen ausgebildet. Nach 18 Stunden zeigen die FTIR-Spektren Charakteristika für antiparallele intermolekulare β -Faltblatt-Strukturen in Aggregaten auf (Abbildung 45c). Hierfür sind die starke Bande bei 1616 cm^{-1} und die Bande bei 1684 cm^{-1} für das rekombinante β_2 -M bezeichnend.^[78] Auch hier liegt für das **ABC_1** wieder ein Unterschied durch die starke Bande bei 1619 cm^{-1} vor.

Abbildung 45:
Aggregations-
Untersuchungen mittels
FTIR-Spektroskopie

a) in DCl,
b) in DCl + 0.2 M NaCl,
nach 3 min,
c) wie b) nach 18 h

rekombinantes β_2 -M
(schwarz) & ABC_1 (rot)



Die exemplarischen Denaturierungs- und Aggregations-Untersuchungen von ABC_1 im Vergleich mit dem rekombinanten β_2 -Mikroglobulin per FTIR-Spektroskopie verdeutlichen, dass die synthetischen linearen β_2 -Mikroglobuline zum einen sehr schnell und überdies eine energetisch sehr stabile Protein-Struktur ausbilden, was die synthetischen Produkte neben der differierenden Sekundär-Struktur vom rekombinanten β_2 -M deutlich unterscheidet. Worin die Ursache der Bildung dieser zwei ABC-Produkte liegt, konnte allerdings nicht geklärt werden.

4.1.4. Protein-Faltung

Die zweite Ligation wurde schließlich für alle drei Proteine (unmarkiertes und die beiden markierten) analog durchgeführt, indem bei pH 6.4 insgesamt 1.2 Äquivalente des N-terminalen Segmentes A-SR in fünf Schritten sukzessiv zum Segment BC zugegeben wurden, um eine intramolekulare Reaktion des Thioesters A-SR gegenüber der intermolekularen NCL zu unterdrücken. Nach erfolgreicher Umsetzung wurde der pH-Wert auf 7.4 erhöht und für eine Stunde weiter inkubiert, um den S→N-Shift quantitativ zu gestalten. Abschließend wurde als Nebenprodukt gebildeter „interner“ Thioester (ABC + A-SR → ABC(A), siehe Abbildung 18), durch Behandlung mit Piperidin wieder gespalten. Im Ergebnis wurden in allen Ansätzen nach chromatografischer Reinigung die zwei oben beschriebenen Protein-Produkte mit identischer Masse, die dem des β_2 -M entspricht, isoliert. Die Ursache für die Bildung zweier Produkte konnte nicht geklärt

werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass sie stabile β -Faltblatt-Strukturen bilden, die sich unterscheiden und damit zwei Peaks in der RP-Chromatografie liefern.

Da keine Bedingungen gefunden wurden, unter denen die synthetischen Produkte vollständig denaturiert werden können und die gleichzeitig als Ausgangssituation für eine Protein-Faltung geeignet wären, wurde für den letzten Schritt der β_2 -Mikroglobulin-Synthese, der Protein-Faltung, das Hauptprodukt der zweiten NCL, **ABC_2**, gewählt, da es strukturell dem rekombinanten Protein ähnlicher ist als **ABC_1** (siehe FTIR-Ergebnisse Abbildung 41). Es bestand die Hoffnung, dass durch Ausbildung der Disulfid-Brücke vielleicht eine native Faltung stabilisiert wird, die sich aus einem Intermediär-Produkt während der Faltung heraus bilden kann. Diese Annahme beruhte auf der Beobachtung, dass natives β_2 -Mikroglobulin in der reduzierten Form eine nativartige Konformation in Abwesenheit von Denaturantien beibehält.^[135]

Zuerst wurden die literaturbekannten Faltungs-Bedingungen^[136] für das rekombinante β_2 -Mikroglobulin untersucht, um den prinzipiellen Verlauf der oxidativen Faltung vom β_2 -M zu studieren. Ein erster Eindruck konnte den analytischen Gelfiltrations-Untersuchungen dieser Faltung entnommen werden. Ausgehend vom rekombinanten β_2 -Mikroglobulin (Abbildung 46, schwarz) erfolgte nach Reduktion mit reduziertem Glutathion (GSH) ein Links-Shift des Peaks (rot). Während der Re-Oxidation und Faltung shiftete der Peak wieder zurück, aber zum Teil über die ursprüngliche Position hinaus. Somit vermittelt das Ergebnis der Gelfiltration eine Einsicht über die Reversibilität der Faltung bei Re-Oxidation, zeigt aber gleichzeitig auch, dass bei der Oxidation des rekombinanten Proteins unter den Bedingungen, unter denen es zuvor erhalten wurde, nicht wieder einheitliches Produkt entsteht.

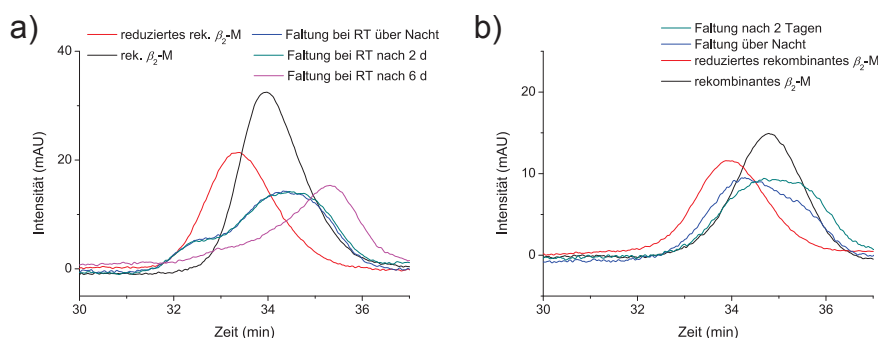


Abbildung 46:
Gestaffelte Gelfiltrations-
Chromatogramme
(Detektion: 220 nm) der
Faltungs-Untersuchungen
am rekombinanten
 β_2 -M nach einer
literaturbekannten
Faltung^[136] fürs β_2 -M

a) Vergleich der Faltung
bei RT und 4 °C,
b) Zeitabhängigkeit der
Faltung

Wie oben aufgeführt, wurde das rek. β_2 -Mikroglobulin zunächst mit GSH reduziert und anschließend re-oxidiert. Der Re-Oxidation ging eine Denaturierung (8.3 M Harnstoff) voraus (Protein-Konz. ca. 22 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), woraufhin die Zugabe zu einem Faltungs-Puffer (500 mM Arginin, 25 mM EDTA, 5 mM GSH, 0.5 mM GSSG, 100 mM Tris•HCl, pH 7.5) unter enormer Verdünnung (1:250) erfolgte^[136]. In der Literatur findet dieser Prozess bei 4 °C über einen Zeitraum von drei Tagen statt.^[136] Die Faltungs-Experimente haben ergeben, dass das Ergebnis deutlich temperaturabhängig ist. D. h., dass eine Faltung bei RT zu schnell abzulaufen scheint (Abbildung 46a), da beobachtet wurde, dass nach einer Faltung über Nacht (blau) ein Shift für das zurück gefaltete β_2 -M zu einer höheren Retentionszeit stattfand, als der des ursprünglich gefalteten β_2 -Mikroglobulins. Dieser Shift verstärkte sich mit zunehmender Faltungsdauer und kehrte nicht zum gewünschten Zustand zurück. Zusätzlich ist die Faltung zeitabhängig (Abbildung 46b), was sich darin äußert, dass sich laut Gelfiltrations-Untersuchungen nach zu langer Verweildauer des β_2 -Mikroglobulins im Faltungs-Puffer eine andere Faltung als die gewünschte einstellt. Dies ist anhand des wiederholten Shiftes des breiten Peaks, für das über einen bestimmten Zeitraum (über Nacht, 2 Tage) im Faltungs-Puffer befindliche β_2 -M, über die gewünschte Position hinaus zu sehen. Unter zur Literatur analogen Bedingungen^[136] konnte somit keine 100 %-ige Re-Oxidation erzielt werden. Dieses Ergebnis ist ebenfalls literaturbekannt, dort wird vermutet, dass die Re-Oxidation durch Aggregation oder Fibrillen-Bildung gestört wird^[137].

Auf der Grundlage der Ergebnisse mit dem rekombinanten β_2 -M wurden die gleichen Bedingungen auf das chemosynthetische β_2 -M angewendet. Auch hier wurde im Vornherein reduziert, um sicher zu gehen, dass die vollständig reduzierte Form vorliegt. Hierbei musste das GSSG:GSH-Verhältnis im Faltungs-Puffer unter Berücksichtigung des bereits anteilig im Harnstoff-Puffer zur Reduktion befindlichen GSH, so angepasst werden, dass ein vergleichbares Verhältnis eingehalten wird. Obwohl die analytische Verfolgung der Oxidation mittels Gelfiltration die gewünschte Proteinfaltung vermuten ließ, zeigte das Ergebnis der RP-HPLC-Untersuchungen klar, dass sich nur ein relativ geringer Anteil des Faltungs-Produktes nach Oxidation über Nacht wie das native Protein verhielt. Eine längere Faltungsdauer führt nicht nur zum starken Verlust an Protein insgesamt, sondern auch zum weitgehenden Verlust an Zielprotein überhaupt (Abbildung 47).

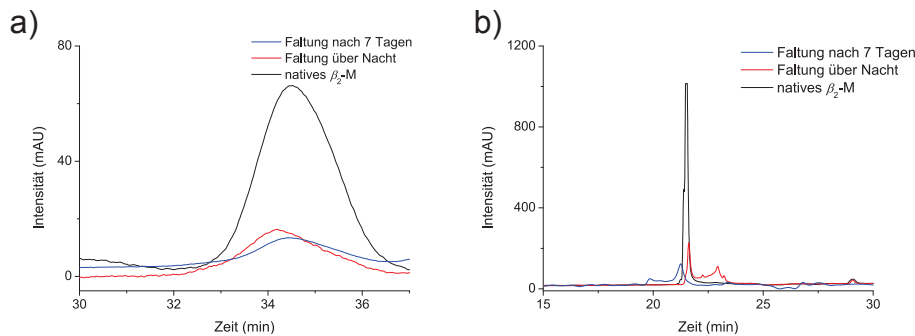


Abbildung 47:
Gestaffelt dargestellte
Analyse des Faltungs-
Verhaltens vom
synthetischen β_2 -M

a) Übereinander
gelegte Gelfiltrations-
Chromatogramme
(Detektion: 220 nm),
b) Übereinander
gelegte RP-HPLC-
Chromatogramme
(Detektion: 220 nm)

Während der präparativen Reinigung nach mehreren Faltungs-Versuchen wurde klar, dass sowohl hinsichtlich der erzielbaren Menge als auch der erreichbaren Qualität auf diesem Weg kein brauchbares gefaltetes β_2 -M erhalten werden konnte. Zum anderen haben anschließende, vergleichende FTIR-spektroskopische Untersuchungen ergeben, dass die Strukturen des synthetisch erhaltenen gefalteten β_2 -M (rot) und des rekombinanten (schwarz) zwar beide die typischen Banden für antiparallele β -Faltblatt-Strukturen gemein haben^[78] (Abbildung 48), die genaue Lage der Banden wiederum voneinander abweicht. Dieses Ergebnis überrascht nicht, da es weder möglich war, die Faltung von einem denaturierten Zustand aus zu initiieren, noch wurde mit **ABC_2** von einer nativartigen, sondern allemal von einer annähernd nativähnlichen Struktur ausgegangen.

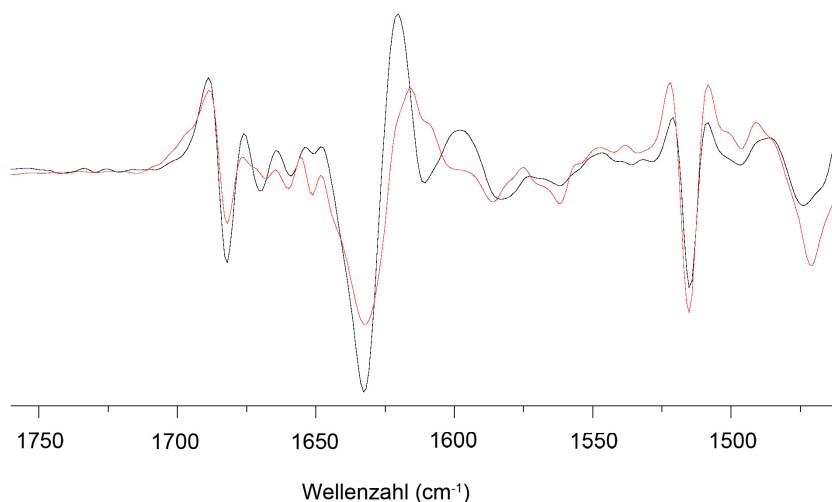


Abbildung 48:
Gestaffelt dargestellte
FTIR-Spektren des
synthetisch erhaltenen
(rot) & rekombinanten
 β_2 -M (schwarz)

Zusammengefasst ist es trotz erheblichen Aufwandes nicht gelungen, die Chemosynthese des β_2 -Mikroglobulins mittels NCL und anschließender Disulfid-Bildung und Faltung zu realisieren. Dabei ergab sich die Limitierung nicht durch aufgefundene Nebenreaktionen bei der NCL, sondern durch die spezifischen Eigenschaften des zu synthetisierenden Proteins, nämlich neben der Molekülgröße von über 10 000 Da, die eine

analytische Charakterisierung schon schwierig gestaltet, vor allem durch die ausgeprägte Tendenz, verschiedene, stabile Faltblatt-Strukturen einnehmen zu können. Insofern markiert der Versuch einer Chemosynthese des β_2 -Mikroglobulins die gegenwärtigen Grenzen der Proteinsynthese, und dabei eher die begrenzte Möglichkeit der analytischen Charakterisierung.

4.2. Semi-Synthese und Charakterisierung der CRF1-Mimetika

Protein-Mimetika der extrazellulären Bindungs-Domäne von GPCRs sind trotz der aktuell rasanten Fortschritte auf dem Gebiet der Struktur-Aufklärung G Protein-gekoppelter Rezeptoren (Nobelpreise für Chemie 2012^{[1]-[3]}) von großem Interesse, da es bisher nicht gelingt, Kristalle hoch flexibler Peptid-Rezeptor-Komplexe zu erhalten. Mehr noch, die flexiblen Rezeptor-N-Termini müssen zur Gewinnung von Kristallen der Klasse B GPCRs durch globuläre Proteine ersetzt werden, was hinsichtlich der wesentlichen Funktion dieser N-Termini für die Bindung von Peptid-Liganden eine starke Limitierung darstellt.

Das bisher einzige derartige Protein-Mimetikum eines GPCR wurde durch eine Kombination chemischer, enzymatischer und rekombinanter Verfahren dargestellt und zeigte beachtliche Affinität zu nativen Peptid-Liganden.^{[65][66]} Für die Architektur dieses Rezeptor-Konstruktes wurde nach dem Prinzip templat-assoziiierter Konstrukte^{[108][109]} der Grundsatz verfolgt, eine möglichst hohe Flexibilität der auf einem linearen Peptid-Templat verknüpften vier Rezeptor-Domänen zu gewährleisten.^{[65][66]} Dadurch sollten diese sich möglichst selbst organisieren können. Mit dem hier verfolgten Ansatz sollte eine Limitierung der Flexibilität erreicht werden, und der Einfluss dieser beschränkten Flexibilität auf die resultierenden Ligand-Bindungs-Eigenschaften bestimmt werden. Die Rigidisierung der Struktur sollte dadurch erreicht werden, dass an der Stelle des linearen Peptid-Templates ein analoges zyklisches Peptid eingesetzt wird. Die Einführung des zyklischen Templates machte eine methodische Weiterentwicklung der bekannten Synthesestrategie erforderlich, da ein zusätzlicher, orthogonaler Syntheseschritt eingefügt werden musste. Der Schwerpunkt dieses Teils der vorliegenden Arbeit bestand jedoch in einer Substitution der Chemosynthese der Rezeptorloops ECL (auch Rezeptorschleifen) durch gentechnische Verfahren, um für zukünftige spektroskopische Analysen von Ligand-Komplexen des Rezeptor-Mimetikums isotopenmarkierte Proteine in die Hand zu bekommen.

4.2.1. Das zyklische CRF1-Konstrukt (CRF1_{zykl})

4.2.1.1. Synthese-Strategie und Realisierung

Für die Zyklisierung des Templates wurde die Thiol-Maleimid-Ligation ausgewählt (Abbildung 49), da sie sich bei der Kupplung der ECLs bereits bewährt hatte. Um am Ende den Vergleich der Bindungs-Eigenschaften der Rezeptor-Konstrukte mit zyklischem und linearem Templat auf gleiche Abstände zwischen den einzelnen Domänen am Templat beziehen zu können,

musste dessen Aufbau und die Strategie zur Synthese modifiziert werden. Der N-terminale ϵ -Aminohexansäure-Rest im linearen Templat, an den ursprünglich noch während der SPPS Maleimidohexansäure für die erste Ligation gekuppelt wurde, wurde durch ein Dipeptid aus Fmoc- β -Ala-Lys((4-Methoxyphenyl)diphenylmethyl (Mmt)) ersetzt. So konnte die Seitenkette des zusätzlich eingebauten Lys noch während der SPPS nach Abspaltung der Mmt-Schutzgruppe separat mit der Maleimidohexansäure umgesetzt werden. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde vor der finalen Abspaltung des Peptides vom Harz nicht abgespalten. Die Zyklisierung über die Maleimido-Gruppe und ein C-terminal zusätzlich eingebautes Cys verlief problemlos und führte zu einem zyklischen Templat mit einer Reinheit von 99 % (Abbildung 50).

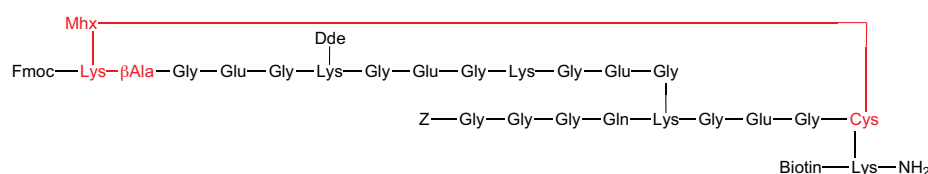


Abbildung 49:
Gerüst des zyklischen
Templates vom
CRF1_{zykl}-Mimetikum

Mhx...
Maleimidohexansäure
 β Ala... β -Alanin
Z...Benzyloxycarbonyl-
Schutzgruppe

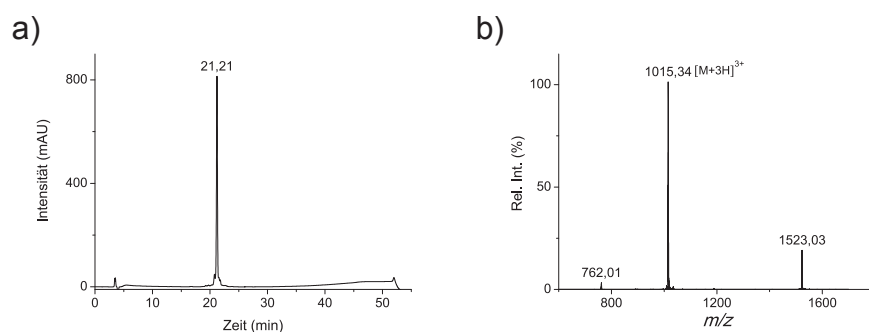


Abbildung 50:
Analyse des zyklischen
Templates

a) RP-HPLC-
Chromatogramm
(Detektion: 220 nm),
b) ESI-ToF-MS-Spektrum
(m/z)

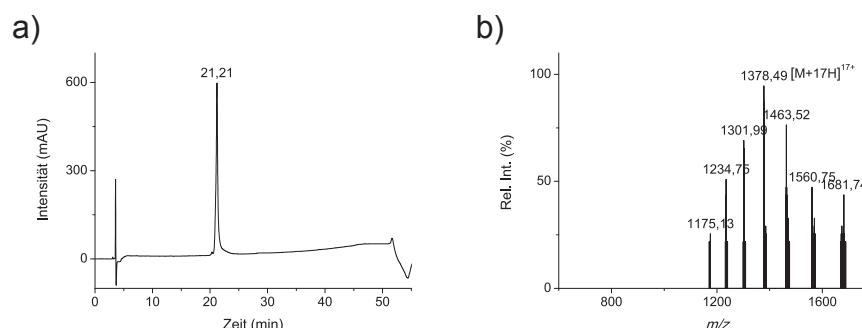
Im Gegensatz zur Synthese des linearen Templates (siehe oben, Abbildung 15) musste für das zyklische eine andere Schutzgruppen-Strategie für die vier Aminogruppen, davon drei für die Mhx-Ester und eine für die Sortase A-vermittelte Kupplung, zur selektiven Einführung von Mhx-Resten gefunden werden. Für das lineare Templat genügte bei Einführung der N-terminalen Mhx nach finaler Abspaltung vom Harz ein orthogonaler Schutz von zwei Aminogruppen durch die Benzyloxycarbonyl- (Z)- (Verknüpfungsstelle für den N-Terminus) und (4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl- (Dde)-Schutzgruppen (Verknüpfungsstelle für ECL2). Die vierte, ungeschützte Aminofunktion (Verknüpfungsstelle für ECL1) störte bei der ersten

Thiol-Maleimid-Ligation zur Einführung von ECL3 nicht. Da ECL3 keine freie Aminogruppe besitzt, konnte im darauffolgenden Schritt die noch freie Aminogruppe des Templates mit Mhx modifiziert werden und zur nächsten Ligation von ECL1 genutzt werden. Erst dann erfolgte die selektive Abspaltung der Dde-Gruppe, wiederum eine Kupplung von Mhx und die Ligation mit ECL2 sowie schließlich eine Z-Abspaltung und enzymatische Kupplung des Rezeptor-N-Terminus. Dieses Vorgehen scheidet für das zyklische Templat aus.

Die Schutzgruppen-Strategie für das zyklische Konstrukt musste durch die zusätzliche Einfuhr eines weiteren Lysins für die Zyklisierung per Thiol-Maleimid-Ligation fünf Aminogruppen berücksichtigt werden. Für die extra Aminogruppe wurde, wie oben aufgeführt, die Mmt-Schutzgruppe für die SPPS gewählt. Nach Reinigung des zyklischen Templates mittels RP-HPLC war bei der Kupplung von Mhx als Ligations-Position für ECL1 zu den für das lineare Templat verwendeten Schutzgruppen (Z- und Dde-Schutzgruppe) ein weiterer orthogonaler Schutz in Form einer Fmoc-Gruppe für den N-Terminus des zur Verzweigung eingeführten Lysins nötig. Da ECL1 keine freie Aminogruppe besitzt, musste hier nichts verändert werden. Daraufhin konnte nach Kupplung von ECL1 die Fmoc-Schutzgruppe vom N-Terminus abgespalten, Mhx eingeführt und mit ECL3 legiert werden. Der folgende Verlauf verlief analog zum linearen Konstrukt: Abspaltung der Dde-Schutzgruppe, Mhx-Kupplung, ECL2-Ligation und anschließend Abspaltung der Z-Schutzgruppe und Srt A-vermittelte Kupplung vom Rezeptor-N-Terminus. Somit konnte das zyklische Konstrukt CRF1_{zykl} in einer ausgezeichneten Reinheit erhalten werden (Abbildung 51).

Abbildung 51:
Analyse des zyklischen
CRF1_{zykl}-Konstruktes

a) RP-HPLC-
Chromatogramm
(Detektion: 220 nm),
b) ESI-ToF-MS-Spektrum
(*m/z*)



4.2.2. Expression und Einbau einer Rezeptorloop-Domäne

Das CRF1-Rezeptor-Konstrukt zeigte schon in früheren Bindungs-Studien eine bemerkenswerte Affinität zu den natürlichen Liganden^{[65][66]}, so dass die Bestimmung der 3D-Struktur solcher Ligand-Konstrukt-Komplexe erste Informationen darüber gestatten sollten, wie die Ligand-Bindung auch an nativen Rezeptoren erfolgen könnte. NMR-Untersuchungen derartiger Protein-Komplexe machen eine Isotopenmarkierung der Domänen notwendig, die in sinnvoller Weise nur über ihre Expression in Bakterienzellen machbar ist. Es war Gegenstand der vorliegenden Arbeit, einen methodischen Ansatz zur Expression zyklischer Peptide in einer ausreichenden Menge und Qualität auszuarbeiten, und den Nachweis zu führen, dass ein so erhaltener extrazellulärer Loop auch im präparativen Maßstab in das Rezeptor-Konstrukt eingebaut werden kann. Um schließlich die Konstrukte mit zyklischem und linearem Templat hinsichtlich ihrer Ligand-Bindungseigenschaften vergleichen zu können, wurde der Einbau des exprimierten Loops an ein lineares Templat vorgenommen.

4.2.2.1. Synthese-Strategie

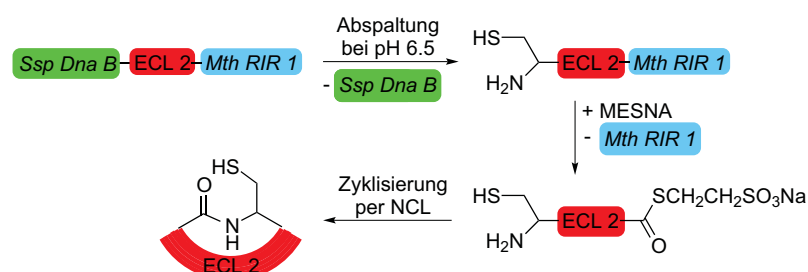
Um eine kosteneffiziente Synthese hinsichtlich der Aufgabenstellung der späteren NMR-spektroskopischen Untersuchungen sequenzabdeckender isotopenmarkierter ECDs realisieren zu können, musste die Synthese-Strategie der Konstrukte dahingehend angepasst werden. Da der N-Terminus bereits per Expression gewonnen wurde^{[65][66]}, fand bereits in früheren Arbeiten auch eine Isotopenmarkierung durch ¹⁵N-angereichertes Nährmedium statt. Eine Chemosynthese der extrazellulären Loops mit isotopenmarkierten AS-Derivaten wäre finanziell nicht tragbar. Ob und wie eine gentechnologische Darstellung auch von Loop-Sequenzen erfolgen kann, sollte nicht per NCL sondern unter Verwendung der EPL studiert werden. Exemplarisch soll hier die Ausführbarkeit am Beispiel des ECL2 demonstriert werden. Diese Änderung sollte jedoch keinen Einfluss auf die restlichen Synthese-Schritte oder das Bindungs-Verhalten des CRF1-Konstruktes haben.

4.2.2.2. EPL des extrazellulären Loops 2 (ECL_{expr}2)

Für die Expression von ECL_{expr}2 wurde der pTWIN2-Vektor^[138] verwendet. Hier wird die DNA des Loops zwischen *Synechocystis dnaB* (*Ssp Dna B*), dem N-terminalen Intein und *Methanobacterium thermoautotrophicum rir1* (*Mth RIR 1*), dem C-terminalen Intein, eingebaut (Abbildung 52).^[138] Die Expression fand in chemikompetenten *Escherichia coli* (*E. coli*) Origami-Zellen statt. Um eine hohe Rate an N-terminaler Inteinspaltung während der EPL zu erzielen, mussten hierfür optimale Bedingungen ermittelt werden. Da *Ssp Dna B* die Eigenschaft hat in Abhängigkeit des pH-Wertes zu spleißen, wurde der in Frage kommende pH-Bereich von 6.0 bis 7.0 untersucht.^[138] Hier hat sich der pH-Wert von 6.5 als vorteilhaft erwiesen. Die Abspaltung von *Mth RIR 1*, was einem Thiol-Austausch entspricht, kann durch die Anwesenheit eines Thiols geschehen, in diesem Fall

MESNA^[138]. Ausgehend von einer Konzentration von 100 mM MESNA wurde untersucht, ob eine Erhöhung des Thiols (150 mM und 200 mM) sich positiv auswirkt. Da keine Ausbeute-Unterschiede ausgemacht werden konnten, wurde der MESNA-Anteil nicht erhöht.

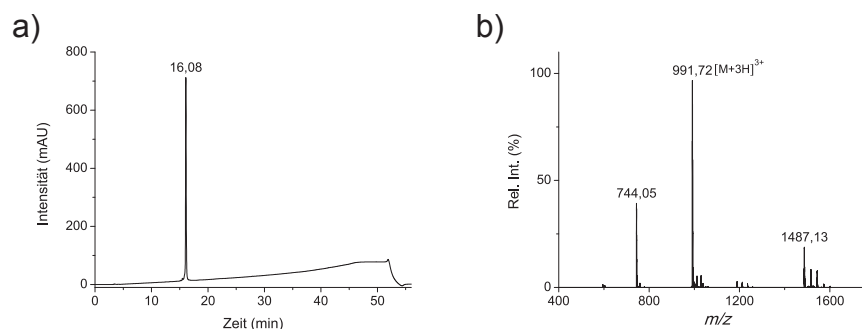
Abbildung 52:
Schema der EPL im
pTWIN2-Vektor vom
 $ECL_{\text{expr}}2$



So konnten bei einem Ansatz von drei Liter Medium 5.33 mg $ECL_{\text{expr}}2$ in einer Reinheit von über 99 % nach RP-HPLC-Aufreinigung gewonnen werden (Abbildung 53). Die Realisierung der Synthese eines zyclischen Peptides in einem mg-Maßstab wurde bislang per EPL noch nicht gezeigt.

Abbildung 53:
Analyse des exprimierten
extrazellulären Loops 2

a) RP-HPLC-
Chromatogramm
(Detektion: 220 nm),
b) ESI-ToF-MS-Spektrum
(m/z)



Der gereinigte $ECL_{\text{expr}}2$ wurde mittels Thiol-Maleimid-Ligation in das chemisch synthetisierte Teil-Konstrukt bestehend aus Temp-ECL1-ECL3 eingebaut. Es wurden ähnliche Ausbeuten für die Ligation zum Temp-ECL1-ECL_{expr}2-ECL3 erzielt wie in der Literatur beschriebenen Prozedur unter Verwendung des chemisch hergestellten ECL2.^{[65][66]} Es wurden mit dem exprimierten Loop über die Stufen der Dde-Abspaltung, die Bildung des Mhx-Esters und die Thiol-Maleimid-Ligation des Loops eine Ausbeute von 44 % gegenüber 47 %^{[65][66]} erzielt. Dabei wurde eine exzellente Reinheit des Produktes erzielt (Abbildung 54)

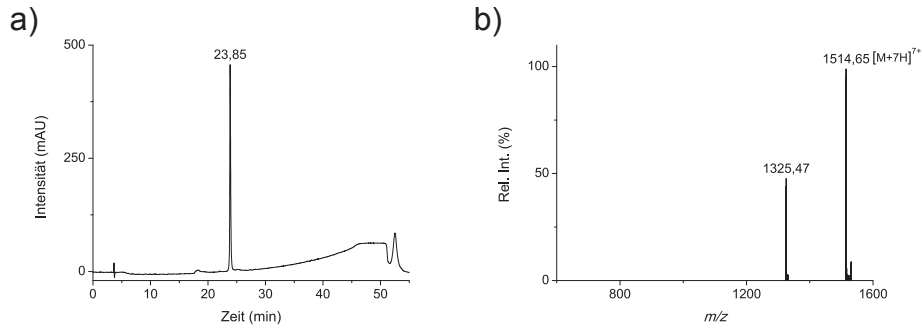


Abbildung 54:
Analyse von der reinen
 $CRF1_{lin/expr}$ -Konstrukt-
Zwischenstufe Temp-
ECL1-ECL_{expr}2-ECL3

a) RP-HPLC-
Chromatogramm
(Detektion: 220 nm),
b) ESI-ToF-MS-Spektrum
(m/z)

Da die nachfolgende Z-Gruppen-Abspaltung und die Sortase A-vermittelte Ligation mit dem Rezeptor-N-Terminus in früheren Arbeiten der Forschungsgruppe in einer Ausbeute von lediglich 14 %^{[65][66]} gelang, wurden hier einige Änderungen durchgeführt. Die Z-Abspaltung fand nicht mehr mit Thioanisol/Ethandithiol/TFA/Trifluormethansulfonsäure (2/1/20/2) und anschließender Aufreinigung per RP-HPLC statt^{[65][66]}, sondern wurde mit Wasser/TFA (1/15) durchgeführt. Diese Variante erfordert zwar verlängerte Abspaltungszeiten, aber die weitere Aufarbeitung erfolgte ohne die zuvor notwendige chromatografische Reinigung direkt nach dem Lyophilisieren. Zudem wurde die enzymatische Ligation des N-Terminus nicht nur mit einem N-Terminus-Überschuss (1.2 Äq.) sondern auch mit deutlich mehr Sortase A (nicht mehr in katalytischen Mengen^{[65][66]}, sondern ebenfalls im Überschuss (2.5 Äq.)) durchgeführt. Nach der abschließenden chromatografischen Reinigung wurde ein zu 98 % reines, lineares $CRF1_{lin/expr}$ -Konstrukt mit einer Ausbeute von 42 % erhalten (Abbildung 55).

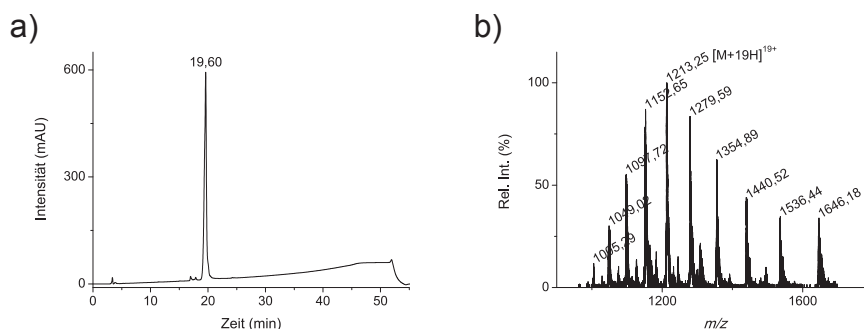


Abbildung 55:
Analyse des linearen
 $CRF1_{lin/expr}$ -Konstruktes

a) RP-HPLC-
Chromatogramm
(Detektion: 220 nm),
b) ESI-ToF-MS-Spektrum
(m/z , mit 0.1 % FA)

4.2.3. Vergleich der Ligand-Bindungs-Eigenschaften von zyklischem und linearem CRF1-Konstrukt

Für das lineare Konstrukt wurde mittels SPA-Assay für Urocortin ($K_d \approx 70$ nM) und mit etwas geringerer Affinität auch für Sauvagin eine bemerkenswerte Bindung gemessen.^{[65][66]} Dabei wird im SPA-Assay am Harz über das eingebaute Biotin des Konstruktes gebundenes Rezeptor-Konstrukt mit einer konstanten Konzentration vom isotoopenmarkierten Liganden [¹²⁵I]-Tyr₀-Sauvagin und variierender Konzentration des zu untersuchenden, unmarkierten Liganden die Verdrängung des Radio-Liganden als Maß für die relative Affinität bestimmt. Es handelt sich hierbei natürlich um die Affinitätsbestimmung an einem nicht glykosylierten Rezeptor-Mimetikum. Um den nativen Bedingungen mehr zu entsprechen, haben wir für die Charakterisierung der Rezeptor-Konstrukte nun einen funktionellen Rezeptor-Assay verwendet. Dabei wird das jeweilige CRF1-Konstrukt im funktionellen GTP γ S-Assay^[139] getestet.

GTP γ S-Assay

Das Prinzip des GTP γ S-Assay besteht darin, dass ein in Säugerzellen exprimierter, also glykosylierter CRF1-Rezeptor in Form von Membranpräparationen gewonnen wird.^[139] Diese Membranpräparationen werden in Gegenwart von nicht hydrolysierbarem [³⁵S]GTP γ S zur Aktivitäts-Bestimmung von Agonisten eingesetzt, in dem die Akkumulation von [³⁵S]GTP γ S nach Stimulierung des Rezeptors mit steigenden Konzentrationen an Agonisten, hier Urocortin oder Sauvagin, gemessen wird.^[139] Diese charakteristischen Dosis-Wirkungs-Kurven dienen nun als Basis. Wird bei der Erstellung von solchen Dosis-Wirkungs-Kurven ein Rezeptor-Mimetikum in steigender Konzentration zugesetzt, erfährt die Dosis-Wirkungs-Kurve eine Rechtsverschiebung, wenn das zugesetzte Mimetikum tatsächlich in der Lage ist, mit dem nativen Rezeptor um die Bindung des Agonisten zu konkurrieren. Erst daraus sollte sich tatsächlich ableiten lassen, ob ein Rezeptor-Mimetikum effektiv um die Ligand-Bindung konkurrieren kann. Besonders interessant ist dieser Ansatz hinsichtlich der allgemein anzutreffenden Diskussion über den Mechanismus der Ligand-Bindung, wonach der Rezeptor-N-Terminus dieser Rezeptor-Klasse die Hauptbindungsstelle darstellen soll.^{[105]-[107]}

Unsere Dosis-Wirkungs-Kurven zeigten bei Verwendung von Urocortin als Agonisten für das zyklische CRF1_{zykl}-Konstrukt einen zwar nicht sehr großen, aber signifikanten Effekt (Abbildung 56). Im Vergleich zum zyklischen Konstrukt, war für das lineare Konstrukt ein geringerer Effekt zu beobachten. Für den Rezeptor-N-Terminus allein war jedoch gar kein Effekt mehr nachweisbar. Dies ist folgendermaßen zu deuten: Der nicht-glykosylierte N-Terminus zeigt in Konkurrenz zum nativen Rezeptor keinen Effekt im funktionellen Assay, besitzt also im betrachteten Konzentrations-Bereich offensichtlich keine Bindung zum Urocortin. Der schwache Effekt des linearen CRF1-Konstruktes, der durch einen minimalen Rechts-Shift angezeigt wird, beweist eine höhere Affinität zum Urocortin. Das Ergebnis verdeutlicht, dass ein oder mehrere

extrazelluläre Loops neben der N-terminalen extrazellulären Domäne wesentlich für die Ligand-Bindung sind. Im Fall des zyklischen CRF1_{zykl} scheint die strukturelle Rigidisierung, welche durch das zyklische Templat gegeben sein sollte, einen positiven Effekt auf die Orientierung der extrazellulären Domänen zu haben. Daraus resultiert eine höhere Affinität zum Agonisten Urocortin und damit eine deutliche Rechts-Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve.

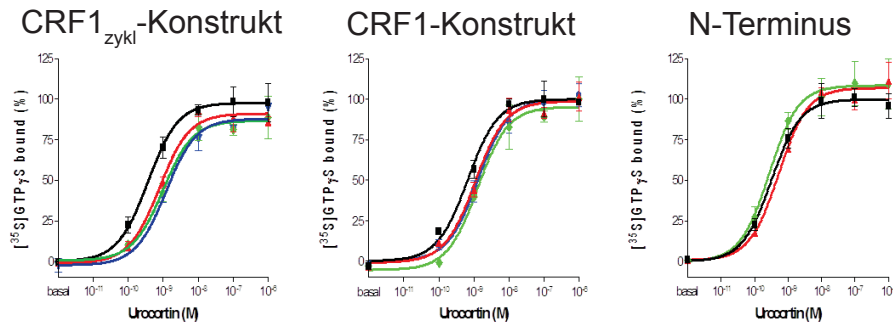


Abbildung 56:
GTP γ S-Verdrängungs-
Assay mit Urocortin
als Liganden für die
Konstrukte CRF1_{zykl}, CRF1
& Rezeptor-N-Terminus

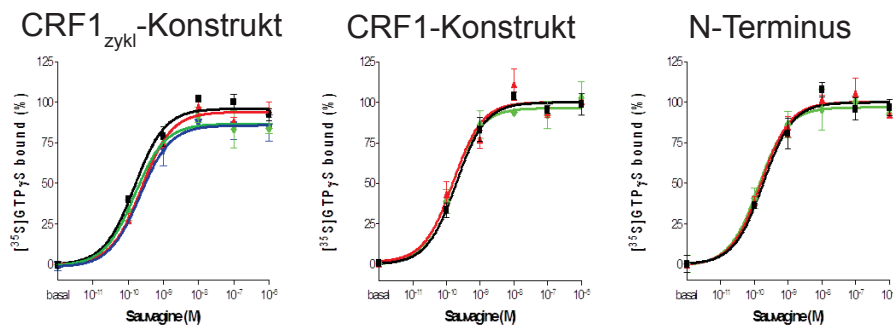
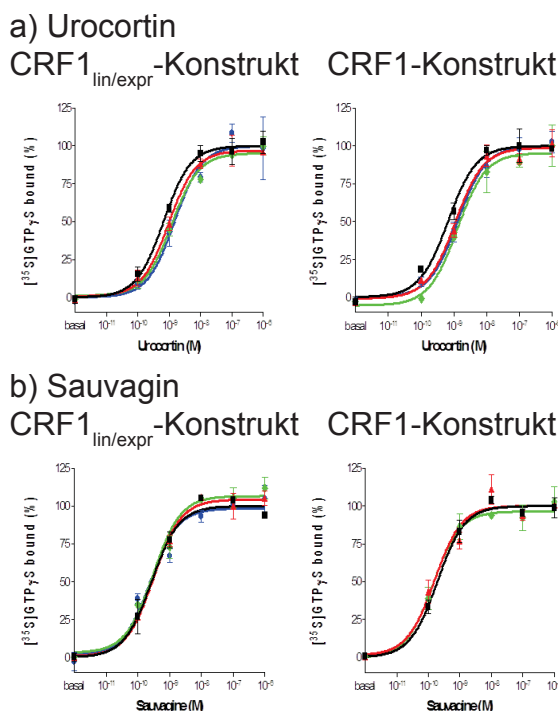


Abbildung 57:
GTP γ S-Verdrängungs-
Assay mit Sauvagin
als Liganden für die
Konstrukte CRF1_{zykl}, CRF1
& Rezeptor-N-Terminus

Für das Sauvagin als Agonist war mit Hilfe des GTP γ S-Assays sowohl für den N-Terminus, als auch für das lineare CRF1-Konstrukt kein und für das zyklische CRF1_{zykl}-Konstrukt nur ein schwacher Effekt zu beobachten (Abbildung 57). Für den N-Terminus ist das Ergebnis nicht verwunderlich, da dieser auch mit anderen Bestimmungsmethoden keine Sauvagin-Bindung zeigt. Das lineare CRF1-Konstrukt hatte im SPA-Assay allerdings eine Sauvagin-Bindung gezeigt^{[65][66]}, aber letztlich ist die Ligand-Bindung, die im Verdrängungs-Assay wo markiertes Sauvagin/Sauvagin am nicht-glykosylierten Rezeptor-Konstrukt gemessen wurde, nicht vergleichbar mit der Konkurrenz von nativen Rezeptor/CRF1-Konstrukt für Sauvagin in natürlicher Membrenumgebung. Dass sich die linearen CRF1-Konstrukte mit chemisch hergestelltem bzw. mit EPL-gewonnenem Produkt erwartungsgemäß gleich verhalten, verdeutlicht Abbildung 58.

Abbildung 58:
GTP γ S-Verdrängungs-
Assay mit
a) Urocortin &
b) Sauvagin für die
linearen Konstrukte
CRF1_{lin/expr} (links) &
CRF1 (rechts)

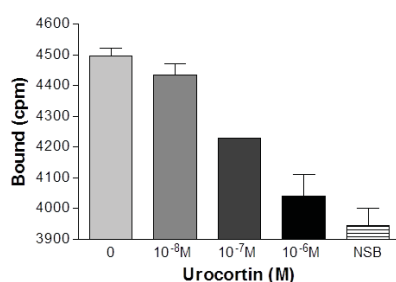


Bindungs-Assay

Neben dem funktionellen GTP γ S-Assay wurde ein Bindungs-Assay entwickelt. Für den Bindungs-Assay werden die CRF1-Konstrukte mit markiertem [125 I]-Tyr₀-Ligand (Urocortin/Sauvagin), „heißem“ Liganden, dessen Bindungs-Eigenschaften gleich dem des „kalten“ Liganden (ohne [125 I]-Tyr₀) sind^[101], versetzt. Das Ganze wird anschließend mit verschieden konzentriertem „kaltem“ Liganden inkubiert, nach Bildung der Ligand-CRF1-Konstrukt-Komplexe an Streptavidin Beads über den Biotin-Anker isoliert und über Messungen des weiterhin gebundenen markierten Liganden ermittelt, ob die Bindung spezifisch ist oder nicht.

Mit diesem Bindungs-Assay ist für das lineare CRF1_{lin/expr}-Konstrukt mit dem exprimierten ECL_{expr} 2 für den Liganden Urocortin eine spezifische Bindung bestimmt worden (Abbildung 44). Es konnte ein EC₅₀-Wert von ca. 100 nM geschätzt werden. Dies liegt im Bereich des für

Abbildung 59:
Bindungs-Assay für
das lineare CRF1_{lin/expr}-
Konstrukt mit Urocortin
als Liganden



das lineare CRF1-Konstrukt bestimmten K_d -Wertes von ca. 70 nM im SPA-Assay, und bestätigen damit die sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit chemisch dargestelltem ECL.

5. ZUSAMMENFASSUNG & AUSBLICK

In Analogie zur Problematik der Synthese „schwieriger“ Peptide^{[140]-[142]} können sich aus den spezifischen Protein-Eigenschaften auch für deren Darstellung erhebliche Schwierigkeiten ergeben, so dass es sinnvoll ist, den Begriff „difficult proteins“ zu adaptieren. Solche Proteine stellen aus unterschiedlichen Gründen eine Herausforderung dar. Einerseits können sich strukturelle Eigenschaften des Proteins oder der Teilsequenzen, wie die Neigung zur Fibrillen-Bildung oder Aggregation und damit einhergehende Löslichkeitsprobleme negativ auf die Synthese auswirken. Andererseits kann die Darstellung von Proteinmodellen mit nicht linearer Rückgrat-Topologie die Kombination verschiedener orthogonaler Methoden zur Verknüpfung einzelner Segmente notwendig machen und somit eine ungewöhnliche Spannbreite chemischer, enzymatischer, gentechnischer und semi-synthetischer Verfahren erfordern.

Zur Demonstration der derzeitigen Grenzen der Protein-Synthese wurde auf Grund früherer Erfahrungen^{[63][64]} das wegen seines Fehlfaltens für die dialysebedingte Amyloidosis verantwortliche β_2 -Mikroglobulin^[69] ausgewählt. Dieses Protein zeigt eine starke Tendenz zur Ausbildung von Aggregaten und Fibrillen, Eigenschaften, die auch für dessen Pathologie verantwortlich sind. Als notwendige Voraussetzung zur Einschätzung der Qualität der Produkte der Semi-Synthese stand für einen direkten Vergleich das rekombinant dargestellte Protein zur Verfügung. In Vorarbeiten wurde die Chemosynthese positionsspezifisch isotoopenmarkierter β_2 -M-Derivate (^{13}C -Tyr₆₆ & ^{13}C -Tyr₇₈) für IR-spektroskopische Untersuchungen zur Fehlfaltung unter Verwendung der nativen chemischen Ligation als Kupplungs-Methode dreier Peptid-Segmente (**A-SR**, **B*-SR**, **C**) angegangen.^{[63][64]} Nach Optimierung der Bedingungen für die SPPS konnten reine Peptid-Segmente dargestellt werden^[64], womit der Ausgangspunkt für die hier vorgestellten Arbeiten gegeben war.

Während des in C→N-Richtung verlaufenden Aufbaues vom β_2 -Mikroglobulin gelang die NCL zwischen den Protein-Segmenten **B*-SR** und **C** zur Bildung von **B*C** reproduzierbar ohne Komplikationen. Die chromatografische Reinigung erfolgte problemlos, wenn der Schutz des N-terminalen Cysteins beibehalten wurde. Überraschenderweise führte die anschließende Ligation mit dem Segment-Thioester **A-SR** zur Bildung von zwei Hauptprodukten, **ABC_1** und **ABC_2**, nebst mehrerer Nebenprodukte. Diese Nebenprodukte waren zum einen ein „interner“ Thioester (**ABC(A)**), welcher durch die Acylierung des Cysteins in Position 80 vom **ABC**-Produkt durch den Thioester **A-SR** gebildet wurde. Dieser „interne“ Thioester wurde durch anschließende Aminolyse mittels Piperidin wieder gespalten. Zum anderen entstand die Säure **A-OH** durch Hydrolyse des Thioesters und ein Nebenprodukt **A(-18)**, welches in Relation zur Säure **A-OH** um 18 Da leichter war. Die analytische Charakterisierung von **A(-18)** ergab, dass es sich hierbei nicht um ein Laktam handeln kann, aber **A(-18)** offensichtlich unter milden basischen Bedingungen hydrolysiert wird. Untersuchungen an entsprechenden Modellpeptid-Thioestern in Abwesenheit nukleophiler Partner für intermolekulare Reaktionen (außer Wasser) haben gezeigt, dass neben

der Bildung von C-terminalem Oxazol, entsprechende AS in der Peptidsequenz vorausgesetzt, auch eine Bildung von intramolekularem Imidazolid und Aspartimid nicht ausgeschlossen werden kann und es sich bei A(-18) um derartige Intermediate handeln kann. Solche Zwischenprodukte können unter Verlust optischer Reinheit zu diastereomeren Nebenprodukten der Ligation führen. Untersuchungen zur optischen Reinheit von **A-SR** zeigten, dass für den eingesetzten Acetamidophenyl-Thioester am C-terminalem Asn prinzipiell Epimerisierung auftreten kann. Für ein Ligations-Produkt zwischen **A-SR** und **BC** konnte jedoch nachgewiesen werden, dass eine Epimerisierung an der Kupplungsposition (Asn₂₄) vernachlässigbar war. Falls sich unter Ligations-Bedingungen aus einem C-terminalen Asparagin-Thioester ein Aspartimid bildet, könnten sich durch dessen Aminolyse α/β -Peptide ergeben, was jedoch in Modell-Untersuchungen nicht beobachtet wurde.

Die Tatsache, dass für voneinander unabhängige Totalsynthesen von linearem β_2 -M reproduzierbar jeweils zwei RP-HPLC-trennbare Hauptprodukte mit der erwarteten Molekülmasse des β_2 -M gefunden wurden, erforderte umfangreiche, analytische Untersuchungen zu dessen Charakterisierung. Da sich eine direkte massenspektrometrische Analyse von Molekülen dieser Größe als sehr schwierig erwies, wurden die isolierten Produkte **ABC_1** und **ABC_2** mittels Trypsin verdaut und die gebildeten Fragmente analysiert. LC-MS-Untersuchungen zeigten, dass die Fragmente völlig identisch waren. Ebenso waren beide Produkte durch Iodacetamid doppelt alkylierbar. Hinsichtlich der korrekten Primär-Struktur ließen sich somit keine Unterschiede nachweisen. CD- und FTIR-spektroskopische Analysen beider Produkte ergaben die typischen Charakteristika einer antiparallelen β -Faltblatt-Struktur, jedoch konnten deutliche Unterschiede für beide Produkte beobachtet werden, die letztlich für das unterschiedliche chromatografische Verhalten verantwortlich sein müssen. Interessanterweise entsprach keine der Strukturen von **ABC_1** und **ABC_2** der des rekombinanten β_2 -Mikroglobulins. Versuche, die synthetischen Proteine entweder chemisch in mehreren Lösungsmitteln, bei unterschiedlichem pH-Wert oder thermisch zu denaturieren, um einen geeigneten Ausgangspunkt zur Proteinfaltung zu bekommen, erwiesen sich als unbrauchbar. Dieses Ergebnis und Studien zum Aggregations-Verhalten machten deutlich, dass sich die antiparallelen β -Faltblatt-Strukturen von **ABC_1** und **ABC_2** sehr schnell bilden und energetisch sehr stabil sind. Da keine chemischen Modifikation nachgewiesen werden konnten, muss davon ausgegangen werden, dass synthetisches, lineares β_2 -M die gefundenen konformationellen Eigenschaften tatsächlich besitzt, ohne dass wir die Ursache für dessen Bildung herausfinden konnten. Es ist nicht ausgeschlossen, dass es gerade diese Struktur des β_2 -Mikroglobulins ist, die in der Pathologie von Amyloidosen eine Rolle spielen kann. Auf Grund der stabilen „Fehlfaltung“ des β_2 -Ms war es nicht möglich, für das chemosynthetische Protein eine Faltung zu einer dem rekombinanten Protein analogen Struktur zu erreichen. Somit gelang zwar eine Chemosynthese des β_2 -Mikroglobulins hinsichtlich seiner Primär-Struktur, aber nicht, ein Produkt mit genau der beschriebenen Raumstruktur zu synthetisieren.

Der zweite Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit galt der Fortsetzung von Untersuchungen zur Synthese und Charakterisierung eines Proteins mit verzweigtem Protein-Rückgrat, dem Modell der Ligand-Bindungsstelle eines GPCRs der Klasse B. Dieses Mimetikum des CRF1-Rezeptors wurde entwickelt, um Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen an einem experimentell zugänglichen Modell spektroskopisch untersuchen zu können^{[65][66]}, da solche membranständigen Proteine keiner direkten, hochauflösenden Strukturanalyse zugänglich waren und im Fall der Klasse B-Rezeptoren noch immer nicht sind. Unter Verwendung einer Synthese-Strategie, die rekombinante, enzymatische und chemische Methoden kombiniert, waren solche templat-basierten Konstrukte^{[108][109]} in unserer Arbeitsgruppe dargestellt worden.^{[65][66]} Dabei werden der exprimierte Rezeptor-N-Terminus und die drei extrazellulären Loops (Rezeptorschleifen) auf einem linearen Peptid-Templat verankert. In Bindungs-Untersuchungen (Ligand-Verdrängung) konnte für dieses CRF1-Konstrukt eine bemerkenswerte Affinität für die natürlichen Liganden Urocortin und Sauvagin gezeigt werden.^{[65][66]} Diese Tatsache bestärkt das Interesse, Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen des CRF1-Konstruktes mit Hilfe NMR-spektroskopischer Strukturanalyse zu untersuchen. Hierzu war nun die Entwicklung eines effizienten Protokolls für die Synthese extrazellulärer Loops, also zyklischer Peptide, mittels expressed Protein Ligation zwingend notwendig, um isotoopenmarkierte Analoga darstellen zu können. Ergänzend sollte die Auswirkung einer Rigidisierung der Struktur des Konstruktes durch die Verwendung eines zyklischen anstatt des linearen Templates untersucht werden, einerseits hinsichtlich möglicher Probleme bei der Synthese des Konstruktes und andererseits der Ligand-Bindungs-Eigenschaften.

Die Realisierung des zyklischen CRF1-Konstruktes erforderte eine Anpassung der Synthese-Strategie. Hier wurde die Zyklisierung des Templates durch eine bereits in der Synthese des linearen Konstruktes erfolgreich durchgeführte Thiol-Maleimid-Ligation^{[65][66]} gewählt. Dafür wurden ein Cystein und ein weiteres Lysin über Maleimidohexansäure verbunden. Das zusätzliche Lysin erforderte für dessen Aminogruppen die Erweiterung der Schutzgruppen-Strategie mit der Mmt- und der Fmoc-Schutzgruppe, sowie eine Änderung der Reihenfolge der Kupplung von ECL1 und ECL3, um einen orthogonalen Synthese-Ablauf zu gewährleisten. Die Kupplung der Rezeptordomänen über Thiol-Maleimid-Reaktion bzw. Sortase A-vermittelte Ligation erfolgte an das zyklische Templat ohne Schwierigkeiten in zum linearen Templat vergleichbaren Ausbeuten. Das zyklische CRF1-Konstrukt konnte hierbei mit einer hohen Reinheit dargestellt werden.

Die Entwicklung eines Protokolls für eine Darstellung zyklischer Peptide mittels EPL wurde exemplarisch für den ECL2 durchgeföhrt. Es gelang unter Verwendung des pTWIN2-Vektors und durch Optimierung der Abspaltungs-Bedingungen für die Inteine *Ssp Dna B* und *Mth RIR 1* die Synthese des peptidischen Loops 2 im 5 mg-Maßstab durchzuführen. Der Einbau des exprimierten Loops hatte auf die Synthese des CRF1-Konstruktes mit linearem Templat erwartungsgemäß keinen negativen Effekt, so dass ein Produkt mit exzellenter Reinheit erhalten wurde. Es wies

in einem Verdrängungsassay die bekannte hohe Affinität zum Peptid-Liganden Urocortin auf. Basierend auf dieser Methode ist die Darstellung isotoopenmarkierter Rezeptor-Konstrukte für NMR-basierte Untersuchungen zur Ligand-Bindung und Protein-Dynamik nun möglich.

Üblicherweise wird zur Bestimmung der Affinität von Proteindomänen zu Liganden der entsprechenden Proteine ein Ligand-Verdrängungsassay benutzt, bei dem die Verdrängung eines markierten Liganden durch einen unmarkierten Liganden an der Domäne gemessen wird. Im Gegensatz dazu haben wir einen funktionellen Bioassay durchgeführt. Das Ergebnis des GTP γ S-Assays bestätigt, dass für eine Bindung von Urocortin unter zellulären Bedingungen, d. h. in Konkurrenz zum glykosylierten Rezeptor, der nicht glykosylierte Rezeptor-N-Terminus eine deutlich geringere Affinität besitzt als ein Komplex aus allen vier extrazellulären Domänen. Darüber hinaus scheint eine Zyklisierung des Templats einen deutlich positiven Effekt auf die Affinität zum Urocortin zu haben, was strukturanalytische Charakterisierungen für die Zukunft erstrebenswerter macht.

Hinsichtlich einer Zuordnung zur Gruppe „difficult proteins“ ist das CRF1-Konstrukt nicht zu berücksichtigen. Dessen Darstellung verlangt bisher zwar eine sehr komplexe Synthese-Strategie verbunden mit einem erheblichen Aufwand, aber die aufgezeigte Einbeziehung der EPL ergibt eine starke Vereinfachung, da alle Domänen, markiert oder unmarkiert, nun exprimiert werden können und mit dem relativ einfach zu synthetisierenden Templat legiert werden können. Das ermöglicht in Zukunft eine einfache Variation der Templat-Strukturen zur Untersuchung des Einflusses auf Ligand-Bindungs-Eigenschaften der CRF1-Konstrukte.

6. EXPERIMENTELLER TEIL

6.1. Materialien und Methoden

6.1.1. Reagenzien

Alle Lösungsmittel und Reagenzien wurden, wenn nicht anders aufgeführt, ohne Behandlung eingesetzt. Die Fmoc-L-AS-Derivate wurden von GL Biochem (Shanghai) Ltd. und die Fmoc-D-AS-Derivate, Pseudoprolin-Derivate, sowie das Boc-Cys-OH, Boc-Ile-OH, Z-Gly-OH und Fmoc- β -Ala-OH wurden von Novabiochem Merck KGaA bezogen. L-Ile-OH, L-Ser-OH und L-Val-OH waren von Reanal. Die Belieferung von Triethylamin, ϵ -Aminohexansäure, GSH, GSSG, HCOOH, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, Tris \cdot HCl, bovine serum albumin (BSA) und Bacitracin wurde durch Merck KGaA ausgeführt. Sämtliche un- und vorbeladenen Harze waren von RAPP Polymere GmbH. Von Ferka Berlin GmbH wurde Acetylchlorid bestellt. Dichlormethan (DCM), d_6 -Dimethylsulfoxid (d_6 -DMSO), KHSO_4 , LB-Medium und MgSO_4 wurden von Carl Roth GmbH & Co. KG geliefert. Gn \cdot HCl war von GERBU Biotechnik GmbH. Zudem waren Ethylacetat, HCl, n-Hexan und TCEP \cdot HCl von Thermo Fisher Scientific Inc. Von VWR International S.A.S. wurde Acetonitril (ACN) und NaCl geliefert. Fmoc-Lys(Dde)-OH, 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-Tetrafluoroborat (HBTU) und HOBt wurden bei IRIS Biotech GmbH bestellt. CaCl_2 , Essigsäure, MeOH, Na_2HPO_4 , NaHCO_3 und NaOH waren von J.T. Baker. N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA), TFA, Trifluoracetanhydrid (99+ %) und Piperidin wurden von Acrös organics bezogen. Von SERVA Feinbiochemica GmbH & Co. waren EDTA, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) und Ninhydrin. Methanolische HCl (3 N) war von Supelco. Die Firma Pharmacia Fine Chemicals lieferte das Sephadex G-50. Harnstoff wurde von AppliChem bezogen. Von TCI Europe N.V. wurde MESNA bestellt und bei Roche Diagnostics Chymotrypsin. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) war von Thermo Scientific Molecular Biology und Sequencing grade modified Trypsin war von Promega. Der pTWIN2-Vektor wurde von New England BioLabs Inc. bezogen. Alle anderen Lösungsmittel und Reagenzien waren von Sigma Aldrich. Wasser wurde in einem Milli-Q-System von Millipore gereinigt und sämtliche Eluenten wurden mit Helium entgast. ^{35}S]GTP γ S wurden von der Hartmann Analytic GmbH geliefert. ^{125}I]-Tyr $_0$ -Sauvagin war von Perkin Elmer und ^{125}I]-Tyr $_0$ -Urocortin von Bachem AG. Die Streptavidin Sepharose Beads (high Performance) waren von GE Healthcare.

6.1.2. Instrumente

Automaten für die Synthese

Automatisierte SPPS wurde an den Synthesizern 433a von Applied Biosystem, P-11 von Activotec oder am Syro II von MultiSynTech durchgeführt.

Präparative RP-HPLC

Zur Aufreinigung der Substanzen wurden mehrere verschiedene präparative RP-HPLC Systeme verwendet.

- System 1: VarianProStar System ausgestattet mit einer semipräparativen PLRP-S Säule (300 x 7.5 mm, 5 µm, 100 Å, Varian).
- System 2: VarianProStar System ausgestattet mit einer VYDAC C18 Säule (250 x 22 mm, 15 µm, 90 Å, Grace VYDAC).
- System 3: VarianProStar System ausgestattet mit einer ProntoSIL Säule (250 x 20 mm, 10 µm, 300 Å, Fa. Bischoff).
- System 4: VarianProStar System ausgestattet mit einer PLRP-S Säule (300 x 25 mm, 10 µm, 300 Å, Agilent Technologies).
- System 5: VarianProStar System ausgestattet mit einer PLRP-S Säule (300 x 50 mm, 10 µm, 300 Å, Agilent Technologies).
- System 6: Dionex System (Pumpe P580, UV-Detektor UVD 170U) ausgestattet mit einer VYDAC C4 Säule (250 x 10 mm, 5 µm, 300 Å, Grace VYDAC).
- System 7: Dionex System (Pumpe P580, UV-Detektor UVD 170U) ausgestattet mit einer PLRP-S Säule (300 x 25 mm, 10 µm, 300 Å, Agilent Technologies).

Für die Reinigungen wurde folgendes Lösungsmittelsystem genutzt: A₁, 0.1 % TFA/H₂O; B₁, 0.1 % TFA/80 % ACN/H₂O mit einer Flussrate von 10 ml/min bzw. von 15 ml/min für System 5 und von 1 ml/min für die semipräparative Säule. Die UV-Detektion wurde bei 220 nm und RT vorgenommen.

Analytische RP-HPLC

Für analytische Zwecke wurden ebenfalls verschiedene RP-HPLC Systeme verwendet.

- System A: Dionex System (Autosampler GINA 50, Pumpe P580, UV-Detektor UVD 170S) ausgestattet mit einer PolyEncap Säule (250 x 4.0 mm, 5.0 µm, 300 Å, Fa. Bischoff).
- System B: Shimadzu System (LC-2010C) ausgestattet mit einer ProntoSIL Säule (250 x 4.6 mm, 5.0 µm, 300 Å, Fa. Bischoff).
- System C: JASCO System (Autosampler AS-2055 Plus, Pumpe PU-2089 Plus, UV-Detektor UV-2077 Plus) ausgestattet mit einer ProntoSIL Säule (250 x 4.6 mm, 5.0 µm, 300 Å, Fa. Bischoff).

Für die Analysen wurde ein Lösungsmittelsystem analog zu den präparativen RP-HPLCs mit einer Flussrate von 1 ml/min und UV-Detektion bei 220 nm bei RT verwendet.

Gelfiltration

Die präparativen Gelfiltrationen wurden in Glassäulen (100 x 2.5 cm) mit dem Packungsmaterial Sephadex G-50 Fine durchgeführt. Es wurden hierfür die Pumpe P-1 und der UV-Detektor Uvicord SII von Pharmacia LKB und ein ABB Metrawatt Servogor 122 X-Y-Schreiber genutzt. Die Flussrate wurde auf 1 ml/min eingestellt und die Absorbationsmessung fand bei 206 nm statt. Der Papiertransport wurde auf 1 cm/h und die Empfindlichkeit des Detektors auf 0.1 AU eingestellt. Die Gelfiltrationen wurden bei RT isocratisch mit HCl/H₂O 1/1000 (V/V) gefahren.

Die analytischen Gelfiltrationen wurden an dem Dionex System (Autosampler GINA 50, Pumpe P580, UV-Detektor UVD 170S) mit einer Superdex 200 HR 10/30 Säule (300-310 x 10 mm, ca. 24 ml Bed-Volumen, Amershan Pharmacia Biotech) durchgeführt. Als Lösungsmittelsystem wurde 6 M Gn•HCl, 0.2 M Na₂HPO₄ unter isochratischen Bedingungen mit einer Flussrate von 1 ml/min und UV-Detektion bei 220 nm bei RT verwendet.

Gas-Chromatografie

Für stereochemische Untersuchungen von Aminosäuren wurde das GC-System 6890 A von Agilent ausgestattet mit einem PTV Injektions-System, einem Flammen-Ionisations-Detektor (FID) und einer Lipodex E Säule (Machery, Nagel, 50 m, 0.25 mm Innendurchmesser, 0.25 µm Filmdicke)^[130]. Helium wurde als Trägergas mit einem konstanten Fluss von 1.0 ml/min verwendet. Nach der Proben-Injektion (1 µl) bei einer Injektions-Temperatur von 200 °C wurde der Injektor auf einen "splitless mode" für 120 s gestellt. Die GC-Ofen-Temperatur wurde von 50 °C auf 80 °C mit einer Heiz-Rate von 1 °C/min, dann auf 155 °C mit einer Rate von 3 °C/min und letztlich auf 220 °C (Endtemperatur für 20 min gehalten) mit einer Rate von 10 °C/min gestellt. Die Detektor-Temperatur war auf 220 °C eingestellt.

pH-Elektrode

Die genaueren pH-Messungen und Einstellungen mit NaOH und HCl wurden an einem WTW inoLab pH Level 2 P System mit einer WTW-pH-Elektrode SenTix 81 (pH 0..14/0..100 °C/3 mol/l KCl) bei RT ausgeführt. Alle anderen pH-Messungen wurden mit Universal Indikator-Papier von Merck KGaA durchgeführt.

Massenspektrometrie

LC-MS wurde an einer Waters Aquity UPLC (wenn nicht anders aufgeführt, Lösungsmittelsystem: A₂, 0.05 % TFA/0.1 % ACN/H₂O, B₂, 0.05 % TFA/99 % ACN/H₂O, ansonsten anstatt 0.05 % TFA 0.1 % FA; Gradient: 5-95 % B₂ in 6 min; Flussrate: 0.2 ml/min; UV-Detektion bei 220 nm

und 30 °C) mit einer Ascentis Express Peptide ES-C18 Säule (30 x 2.1 mm, 2.7 µm, 160 Å, Supelco) durchgeführt. Die UPLC war on-line mit einem Waters LCT Premier Massenspektrometer ausgestattet, welche einen ToF Massendetektor an eine ESI-Quelle gekoppelt hat.

MALDI-MS-Messungen wurden entweder am MALDI-ToF/ToF 4700 Proteomics oder 5800 Proteomics Analyzer von Applied Biosystems bei einer Frequenz von 200 Hz vermessen. Hierfür wurde auf dem MALDI-Target 1 µl Probe (1 mg/ml in 0.3 % TFA/40 % Wasser/ACN) und 1 µl Matrix-Lösung (5 mg/ml α -Cyano-4-hydroxymethylsäure in 0.3 % TFA/40 % Wasser/ACN) aufgetragen und an der Luft bei RT getrocknet. Es wurden für den Massebereich 600-3 000 Da der Peptide Mode und für den Bereich 2 000-30 000 Da der Linear Middle Mass Mode verwendet.

Die MS/MS-Messungen wurden an einem LC-MS-System mit dem Eksigent 2D nanoflow LC System von Axel Semrau (Lösungsmittelsystem: A₃, 0.1 % FA/H₂O, B₃, 0.1 % FA/ACN; Gradient: 4-24 % B₃ in 40 min; Flussrate: 300 nl/min) mit einer C18 PepMap Vorsäule (5 µm, 0,3 x 5 mm, Dionex) mit Viper-Anschluss und einer PepMap Säule (3 µm, 75 µm x 250 mm, Dionex) durchgeführt. Die LC war on-line mit einem LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer von Thermo Fisher Scientific Inc. ausgestattet. Die Parameter der verwendeten Messmethode Top4 lauten wie folgt: MS: Auflösung 60 000, Bereich: 375-1 500 Da; MS/MS: CID in LTQ, Schwellwert: 3 x 10⁵, nur 2 und 3-fach geladene Precursoren, AGC Target Wert: 2 x 10⁴, max. Füllzeit 2 sec, 1 µscans, dynamischer Ausschluss gemessener Massen für 120 sec Standard Fragmentierung mit 35 % Collision Energy.

NMR-Spektroskopie

Die Proben für die NMR-Spektroskopie wurden in 600 µl *d*₆-DMSO gelöst und in 5 mm Probenröhrchen überführt. Die NMR-Spektren wurden zum einen bei 300 K an einem Bruker DPX 300 mit 300 MHz (¹H-Frequenz) in einem 5 mm QNP Probenkopf und einem einachsialen selbstabgeschirmten Gradienten aufgenommen. Zum anderen fanden die Messungen bei 300 K an einem Bruker AV-III mit 600 MHz (¹H-Frequenz) in einem 5 mm QXI-quadruple resonance Probenkopf/5 mm TCI-triple resonance Probenkopf und einem einachsialen selbstabgeschirmten Gradienten statt. Alle homonuklearen zwei-dimensionalen Spektren (DQF-COSY^[143], ROESY^{[144][145]}) wurden mit 2 048 x 512 Datenpunkten aufgenommen. DQF-COSYs wurden unter der Verwendung von 8 Scans und ROESYs mit 64 Scans und einer Mischzeit von 100 msec aufgenommen. Um die Signale restlichen Wassers zu eliminieren, wurde eine Niedrigenergievorabsättigung verwendet. Heteronukleare, zwei-dimensionale ¹³C-HMQC-Spektren^[146] wurden mit 512 x 512 Datenpunkten und 96 Scans aufgenommen. Alle heteronuklearen Spektren wurden unter der Verwendung eines BIRD-Pulses zur Unterdrückung

der an $^{12}\text{C}^{[147]}$ gebundenen Protonen durchgeführt. Die chemische Verschiebung δ wird in ppm angegeben. Als interner Standard wurde d_6 -DMSO (^1H -NMR: 2.50 und $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR: 39.51) verwendet. Tetramethylsilan diente als externer Standard.

CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden in einer Quarzküvette (1 mm Rechteckküvette) mit dem J-720 der Firma JASCO über einen Wellenlängenbereich von 185-260 nm aufgenommen. Die Kalibrierung fand mit einer wässrigen (+)-10-Campfersulfonsäure-Lösung statt. Die Messungen wurden mit einer Bandbreite von 2.0 nm, einem Datenabstand von 0.1 nm, einer Scangeschwindigkeit von 100 nm/min, einer Akkumulation von 10 und bei 25 °C durchgeführt. Sowohl die Probe, als auch das Lösungsmittel H_2O wurden in der selben Küvette unter identischen Bedingungen vermessen und das Spektrum letzterer Messung vom Probenspektrum subtrahiert. Die Berechnung der molaren Elliptizität wurde nach folgender Gleichung ermittelt:

$$[\theta] = \frac{\psi}{c \cdot d}$$

$[\theta]$molare Elliptizität [$\text{deg} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}$]

ψElliptizität [grad]

cKonzentration [mol/l]

dSchichtdicke [cm]

FTIR-Spektroskopie

Die Infrarot-Messungen wurden in einer CaF_2 IR Küvette mit einer optischen Weglänge von 50 μm an einem Bruker IFS-28B FTIR-Spektrometer mit DTGS Detektor durchgeführt. Der Probenraum wurde kontinuierlich mit trockener Luft gespült. Die Spektren wurden entweder mit 32 (am Anfang der kinetischen Experimente) oder mit 128 (an späterer Stelle) Interferogrammen angelegt. Der zero filling factor für die Fouriertransformation betrug 4, womit Spektren mit normaler Auflösung von 4 cm^{-1} (≈ 1 Datenpunkt pro 1 cm^{-1}) erhalten wurden. Mit Hilfe eines temperierbaren Zellmantels wurde die Temperatur der Proben kontrolliert. Um Probleme, welche durch Baseline-Schwankungen oder Veränderungen der trockenen Atmosphäre im Spektrometer bedingt sind, zu minimieren, wurden die Proben in motorische Proben-Shuttle platziert. Dies erlaubte eine Aufnahme des Hintergrundes direkt vor der Aufnahme der Probenspektren, ohne dass der Probenraum zwischenzeitlich geöffnet werden musste. Die Lösungsmittelspektren wurden unter identischen Bedingungen aufgenommen und von den Probenspektren subtrahiert. Spektrale Störungen durch restlichen Wasserdampf wurden mittels eines Wasserdampf-Spektren-Satzes eliminiert. Die zweiten Ableitungen wurden mit dem Savitzky-Golay Algorithmus mit 13-Punkt Glättung erhalten.^[78] Die Messungen fanden in deuteriertem Lösungsmittel nach kompletten H/D-Austausch statt. Die Vollständigkeit des Austausches der Amino-Protonen mit Deuterium

wurde erreicht, indem die Proteine über Nacht bei 37 °C in der Lösung blieben und durch die Anwesenheit der Amid A Bande (N-H-Streckschwingung der Peptid-Gruppen bei $\approx 3300\text{ cm}^{-1}$) bestätigt.

6.1.3. Methoden

Alle Mengenangaben der eingesetzten Reagenzien beziehen sich auf die Beladung von 1 g des jeweils eingesetzten Harzes. Es wurden für die parallel synthetisierten Peptide 250 mg Harzansätze verwendet und alle anderen Synthesen hauptsächlich mit 1 g Harzansätzen durchgeführt. Für die parallelen Synthesen wurden die Reagenzmengen entsprechend auf ein viertel verringert.

Automatisierte SPPS

Die automatisierten Festphasen-Synthesen wurden am 433a von Applied Biosystems^[148] oder am P-11 von Activotec unter einer Stickstoff-Atmosphäre durchgeführt (1 g Harzansätze). Am Syro II von MultiSynTech wurden parallel mehrere Peptide an der Luft synthetisiert^[149] (250 mg Harzansätze). Alle Synthesen fanden bei RT statt. Zum Einsatz kamen die Harze ClTrt-Cl (0.2 mmol/g Beladung), TentaGel-S-Trt-Chlorid (0.25 mmol/g Beladung), TentaGel-S-Trt-Gly-OH (0.26 mmol/g Beladung) und TentaGel-S-RAM (0.2-0.27 mmol/g Beladung).

Für die Synthesen einzelner Peptide wurde die Fmoc-Strategie mit Doppelkupplungen (1 x 10 min & 1 x 20 min) genutzt. Die Kupplungen fanden unter Zugabe von 2 ml HBTU (0.5 mol/l in Dimethylformamid (DMF), 4 Äq.)/HOBt (0.5 mol/l in DMF, 4 Äq.) und 1 ml DIPEA (2 mol/l in N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP), 16 Äq.) in angegebener Reihenfolge zu 2 ml der entsprechenden Fmoc-AS (1 mmol/l in DMF, 8 Äq.) statt. Die Fmoc-Abspaltungen wurden mit 5 ml einer 20 %-igen Piperidin-Lösung in DMF (mind. 3 x 2.5 min) vollzogen. Zwischen den einzelnen Kupplungen fand eine Waschung mit DMF (5 x 5 ml) statt.^[148]

Die parallelen Synthesen wurden ebenfalls mittels Fmoc-Chemie mit Doppelkupplungen (2 x 20 min) ausgeführt. Für die Kupplungen wurden 500 µl der entsprechenden Fmoc-AS (0.5 mol/l in DMF, 4 Äq.) mit 500 µl HBTU (0.5 mol/l in DMF, 4 Äq.)/HOBt (0.5 mol/l in DMF, 4 Äq.) und 250 µl DIPEA (2 mol/l in NMP, 16 Äq.) in angegebener Reihenfolge eingesetzt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen fand mit 2 ml einer 20 %-igen Piperidin-Lösung in DMF statt.

Manuelle Fmoc-Abspaltung

Die manuelle Fmoc-Abspaltung wurde mit jeweils 10 ml einer 20 %-igen Piperidin-Lösung in DMF (1 x 5 min & 1 x 10 min) unter Schütteln bei RT durchgeführt.^[150]

Bestimmung der Harzbeladung

Über die UV-spektroskopische Bestimmung bei 301 nm der abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppe wurde die Beladung des Harzes unter Zuhilfenahme folgender Formel, bezogen auf 1 g Harz, ermittelt:

$$\text{Beladung} = \frac{A}{\epsilon \cdot d} \cdot v \cdot V$$

A.....Absorption

ϵ molarer Extinktionskoeffizient (8 000 l/(mol • cm))

d.....Küvettenlänge (1 cm)

v.....Verdünnung (200-fach)

V.....Volumen an Abspalllösung (20 ml)

Kaiser-Test

Als sehr empfindlichen Nachweis für freie Aminogruppen wurde der Kaiser-Test genutzt. Hierfür wurden ein paar Harzperlen mit 100 µl KCN in Pyridin (2 ml 0.001 M KCN in 98 ml Pyridin) und 100 µl 5 % Ninhydrin in Ethanol (W/V) versetzt und 5 min auf 110 °C erwärmt. Freie Aminogruppen wurden durch eine Blaufärbung angezeigt.^[151]

Thioesterbildung

Nach einer etablierten Synthesevorschrift^[44] wurde die Thioesterbildung mit *para*-Acetamidothiophenol (*p*-Aatp) durchgeführt. Zunächst wurde das Peptid vom Trityl-Harz abgespalten (20 ml, Essigsäure (AcOH)/Trifluorethanol/DCM, 1/1/3, V/V/V, 1 h)^[152], im Vakuum konzentriert, sechs Mal in Pethrolether aufgenommen und abermals eingeeengt, um anschließend zwei Mal in Dioxan gelöst und lyophilisiert zu werden. Das seitenketten-geschützte Peptid wurde anschließend in DCM aufgenommen und mit 1.5 Äq. HOBt, sowie mit 1.5 Äq. N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 10 Äq. *p*-Aatp am Anfang und wiederholt nach 4 h versetzt und über Nacht bei RT gerührt.

Tryptischer Verdau

Zum Verdau mit Trypsin wurde dem Promega-Standard Protokoll gefolgt.^[153] Es wurden zu 5 µl einer Probenlösung (≈2 µg/µl in 100 mM Ammonium-Bicarbonat (ABC)) 5 µl einer Trypsin-Lösung (≈0.04 µg/µl in 100 mM ABC) und 5 µl einer 100 mM ABC-Lösung gegeben und

bei 37 °C geschüttelt. Abstoppen des Verdaus geschah durch Zugabe von 2 µl einer 10 %-igen TFA-Lösung. Bei größeren Ansätzen wurden die Volumina entsprechend angepasst.

Chymotryptischer Verdau

Die Verdaue mit Chymotrypsin wurden analog derer mit Trypsin durchgeführt, ausgenommen der Temperatur, diese betrug 25 °C.

6.2. Synthesen und Experimente

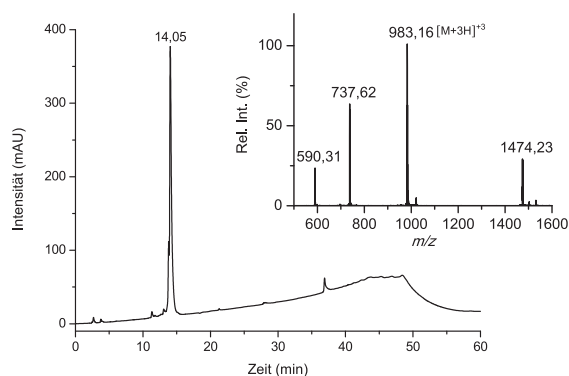
6.2.1. Synthese des β_2 -Mikroglobulins

6.2.1.1. Synthese des N-terminalen Segmentes (Segment A-SR)

Für die Synthesen wurde jeweils 1 g TentaGel-S-Trt-Chlorid-Harz mit der C-terminalen AS Fmoc-Asn(Trt)-OH manuell beladen. Hierfür wurde das Harz mit 10 ml einer 20 %-igen Acetylchlorid-Lösung in DCM versetzt und 4 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde mit DCM gewaschen und das Harz mit 180 mg Fmoc-Asn(Trt)-OH (0.3 mmol, 1.5 Äq.), 10 ml DCM und 102.6 µl DIPEA (0.6 mmol, 3 Äq.) versetzt und über Nacht bei RT geschüttelt.^[152] Für die automatisierten SPPS am 433a, welche unter Einsatz von Fmoc-Tyr(*t*Bu)-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH, Fmoc-Lys-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH und Boc-Ile-OH für die N-terminale AS stattfanden, wurde das Harz zuvor mit DCM und DMF gewaschen. Nach den automatisierten SPPS wurde das Segment vom Harz abgespalten und zum Thioester umgesetzt. Abschließend wurden die Seitenketten-Schutzgruppen manuell abgespalten (200 mg Phenol/800 µl H₂O/20 ml TFA/800 µl Triisopropylsilan (TIPS), 4 h, RT)^[150], das Lösungsmittel im Vakuum eingengt, das Segment sechs Mal in Diethylether (Ether) gefällt, zentrifugiert (5 min, 4 000 x g) und abdekantiert. Vor den präparativen RP-HPLCs (System 7) wurde das Segment in 0.1 % TFA/50 % ACN/H₂O aufgenommen und lyophilisiert.

Sequenz

IQ RTP KI QVY SRHPA ENGKS NFLN-Aatp



Ausbeute

28 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

t_R = 14.05 min (Reinheit 96 %)

LC-MS

t_R = 1.79 min,

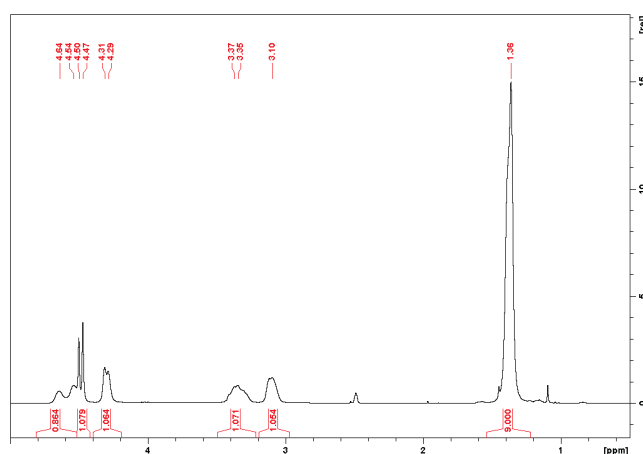
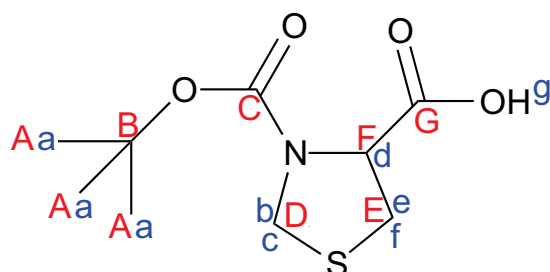
gefunden: 2 946.47 Da,

berechnet: 2 945.51 Da (2 947.33 Da Ø)

6.2.1.2. Synthese der N-Boc-Thioazolidin-4-carbonsäure (Boc-Thz-OH)

Für die Synthesen von Boc-Thz-OH wurden für Lösung A 2 mg der Thioazolidin-4-carbonsäure (15 mmol) mit 3.2 ml Triethylamin (22.5 mmol, 1.5 Äq.) in 20 ml DCM gelöst und im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Für Lösung B wurden 4 mg (18 mmol, 1.2 Äq.) Di-*tert*-butylcarbonat in 40 ml DCM gelöst. Anschließend wurde Lösung B langsam zu Lösung A getropft und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösungen wurden dann im Vakuum aufkonzentriert, in Ethylacetat gelöst und mit 5 % KHSO₄ (3 x 20 ml) und gesättigtem NaCl (3 x 20 ml) extrahiert. Anschließend wurde das Boc-Thz-OH über MgSO₄ getrocknet, im Vakuum aufkonzentriert und in n-Hexan gefällt und filtriert.^[154]

Strukturformel



Ausbeute

62 %, weißes Pulver

¹H-NMR (300.2 MHz, d₆-DMSO), δ [ppm]

4.71-4.52 (m, 1 H, d), 4.49 (d, 1 H, J = 8.8 Hz, b/c), 4.30 (d, 1 H, J = 8.8 Hz, b/c), 3.45-3.23 (m, 1 H, e/f), 3.17-3.02 (m, 1 H, e/f), 1.36 (s, 9 H, a)

¹³C{¹H}-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO), δ [ppm]

171.9 & 171.6 (1 C, G), 152.6 (1 C, C), 80.0 (1 C, B), 61.1 (1 C, F), 48.6 & 47.8 (1 C, D), 34.0 & 32.7 (1 C, E), 27.9 (3 C, A)

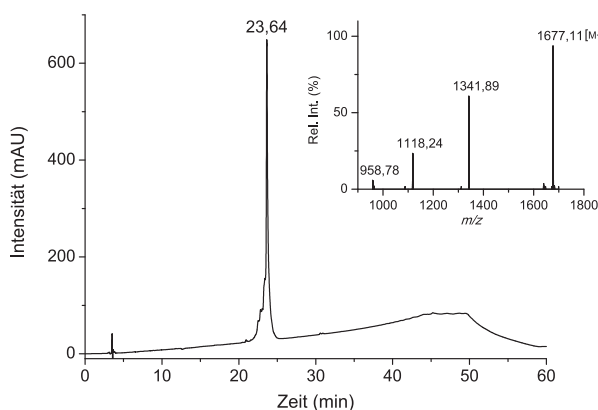
6.2.1.3. Synthese des mittleren Segmentes (Segment B*-SR)

Unmarkiertes mittleres Segment (B*-SR)

Für die Synthesen wurden jeweils 1 g ClTrt-Cl-Harz mit der C-terminalen AS Fmoc-Ala-OH manuell beladen. Hierfür wurde das Harz mit 106 mg Fmoc-Asn(Trt)-OH (0.3 mmol, 1.5 Äq.), 10 ml DCM und 274 µl DIPEA (1.6 mmol, 8 Äq.) versetzt und 1 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde für 15 min mit 200 µl DIPEA in 2 ml MeOH bei RT geschüttelt.^[152] Für die automatisierten SPPS am 433a oder P-11, welche unter Einsatz von Fmoc-Lys(Boc)-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH und Fmoc-Tyr(Trt)-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH stattfanden, wurde das Harz mit DCM und DMF gewaschen. Die Abspalllösung für die Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 1 % HCOOH (V/V)^[92] versetzt. Nach den automatisierten SPPS wurde zunächst manuell Boc-Thz-OH gekuppelt. Dies wurde mit 77 mg HOBt (0.5 mmol, 2 Äq.), 77.5 µl DIC (0.5 mmol, 0.5 Äq.) und 117 mg Boc-Thz-OH (0.5 mmol, 2 Äq.) in 10 ml DCM über Nacht bei RT durchgeführt.^[155] Anschließend wurde das Segment vom Harz abgespalten und zum Thioester umgesetzt. Daraufhin wurden die Seitenketten-Schutzgruppen manuell abgespalten (200 mg Phenol/800 µl H₂O/20 ml TFA/800 µl TIPS, 3 h, RT)^[150], das Lösungsmittel im Vakuum eingengt, das Segment sechs Mal in Ether gefällt, zentrifugiert (5 min, 4 000 x g) und abdekantiert. Vor den präparativen RP-HPLCs (System 7) wurde das Segment in 0.1 % TFA/50 % ACN/H₂O aufgenommen und lyophilisiert.

Sequenz

Thz-YVSG FHPSD IEVDL LKNGE RIEKV EHSDL SFSKD WSFYL LYYTE FTPTE
KDEYA-Aatp



Ausbeute

25 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

t_R = 23.64 min (Reinheit 89 %)

LC-MS

t_R = 2.96 min,

gefunden: 6 704.15 Da,

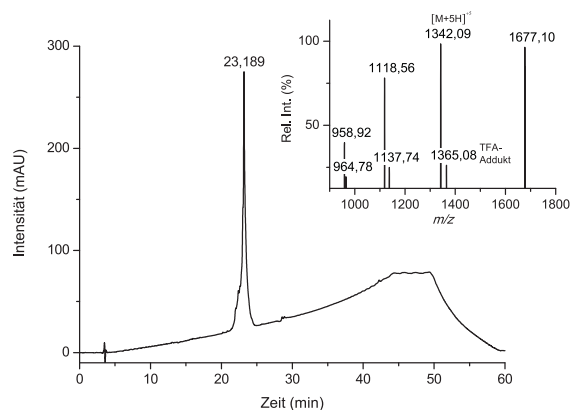
berechnet: 6 700.46 Da (6 704.44 Da Ø)

*¹³C-Tyr₆₆-markiertes mittleres Segment (¹³C-Tyr₆₆ **B***-SR)*

Die an Position Tyr₆₆ ¹³C-markierten mittleren Segmente wurden analog zu den unmarkierten mittleren Segmenten am 433a oder P-11 synthetisiert. Eine Abweichung stellt die manuelle Kupplung der markierten AS dar. Hierfür wurden die Synthesen am Automaten kurzzeitig unterbrochen. Die präparativen RP-HPLCs wurden am System 5 durchgeführt.

Sequenz

Thz-YVSG FHPSD IEVDL LKNGE RIEKV EHSDL SFSKD WSFYL **L**YTE FTPTE
KDEYA-Aatp

*Ausbeute*

20 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

t_R = 23.19 min (Reinheit 88 %)

LC-MS

t_R = 2.96 min,

gefunden: 6 705.12 Da,

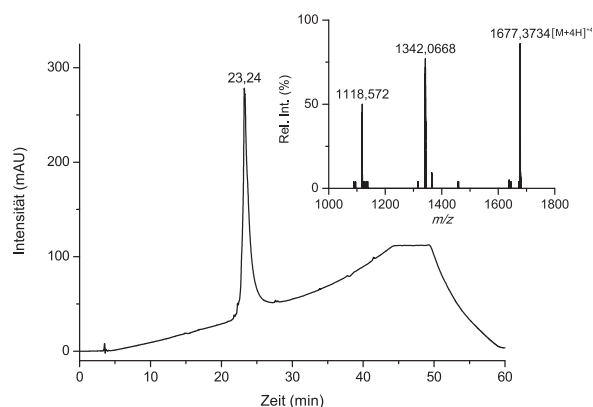
berechnet: 6 701.46 Da (6 705.44 Da Ø)

*¹³C-Tyr₇₈-markiertes mittleres Segment (¹³C-Tyr₇₈ **B***-SR)*

Die an Position Tyr₇₈ ¹³C-markierten mittleren Segmente wurden analog zu den unmarkierten mittleren Segmenten am 433a oder P-11 synthetisiert. Eine Abweichung stellten die manuellen Kupplungen vor den automatisierten SPPS der markierten AS dar. Die präparativen RP-HPLCs wurden am System 5 durchgeführt.

Sequenz

Thz-YVSG FHPSD IEVDL LKNGE RIEKV EHSDL SFSKD WSFYL **L**YTE FTPTE
KDE**Y**A-Aatp

*Ausbeute*

5 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

t_R = 23.24 min (Reinheit >99 %)

LC-MS

t_R = 2.86 min,

gefunden: 6 705.38 Da,

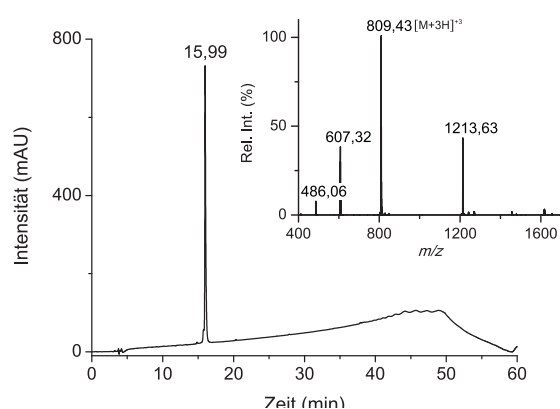
berechnet: 6 701.46 Da (6 705.44 Da Ø)

6.2.1.4. Synthese des C-terminalen Segmentes (Segment C)

Für die Synthesen wurden jeweils 1 g ClTrt-Cl-Harz mit der C-terminalen AS Fmoc-Met-OH manuell beladen. Hierfür wurde das Harz mit 113 mg Fmoc-Met-OH (0.3 mmol, 1.5 Äq.), 10 ml DCM und 274 µl DIPEA (1.6 mmol, 8 Äq.) versetzt und 1 h bei RT und anschließend für 15 min mit 200 µl DIPEA in 2 ml MeOH bei RT geschüttelt.^[152] Für die automatisierten SPPS am 433a oder P-11 wurde das Harz mit DCM und DMF gewaschen. Die Abspalllösung für die Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 1 % HCOOH (V/V)^[92] versetzt. Nach den automatisierten SPPS wurden simultan die Seitengruppen entschützt und das Peptid vom Harz abgespalten (200 mg Phenol/800 µl H₂O/20 ml TFA/800 µl TIPS, 3 h, RT)^[150], das Lösungsmittel im Vakuum eingengt, das Segment sechs Mal in Ether gefällt, zentrifugiert (5 min, 4 000 x g), abdekantiert und in 0.1 % TFA/50 % ACN/H₂O aufgenommen und lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden in 20 ml H₂O gelöst und bei 60 °C 1 h lang gerührt.^[95] Nach Einengen des Lösungsmittels wurde nochmals lyophilisiert, bevor die Reinigungen (System 5) durchgeführt wurden.

Sequenz

CRVNH VTLSQ PKIVK WDRDM



Ausbeute

23 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

t_R = 15.99 min (Reinheit >99 %)

LC-MS

t_R = 1.71 min,

gefunden: 2 425.26 Da,

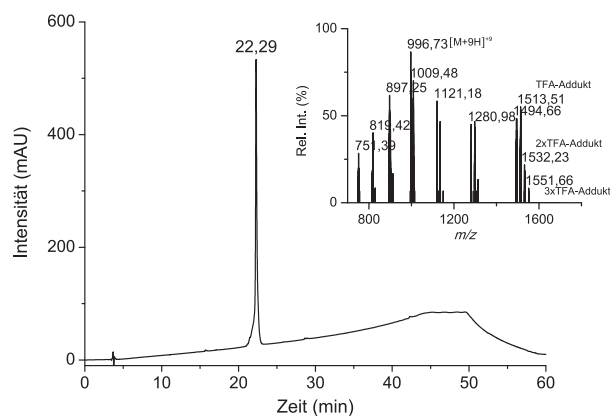
berechnet: 2 424.25 Da (2 425.87 Da Ø)

6.2.1.5. Erste native chemische Ligation zum Segment B*C

Für die erste NCL wurde zu 6 ml eines Puffers aus 6 M Gn•HCl und 0.2 M Na₂HPO₄ ein Überschuss an TCEP•HCl (15.4 mg, 53.7 mmol, 8 Äq.) gegeben und der pH-Wert über eine pH-Elektrode mit NaOH und HCl auf 7.2 eingestellt. Anschließend wurden 44.93 mg B*-SR (6.7 mmol, oder entsprechend die markierten Segmente) und 35.74 mg Segment C (14.8 mmol, 2.2 Äq.) dazu gegeben, was in einem pH-Wert von 6.0 und einer insgesamten Peptid-Konzentration von ≈13 mg/ml resultierte. Die Ligations-Gemische wurden für 4 h bei RT geschüttelt und anschließend für 1 h mit 30 mg TCEP•HCl (111.7 mmol, 16 Äq.) bei pH 7 und RT unter Schütteln behandelt. Die Reinigungen wurden in direktem Anschluss durchgeführt (System B).

Sequenz (unmarkiert)

Thz-YVSG FHPSD IEVDL LKNGE RIEKV EHSDL SFSKD WSFYLYYYTE FTPTE KDEYA
CRVNH VTLSQ PKIVK WDRDM

*Ausbeute*

58 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

$t_R = 22.29$ min (Reinheit >99 %)

LC-MS

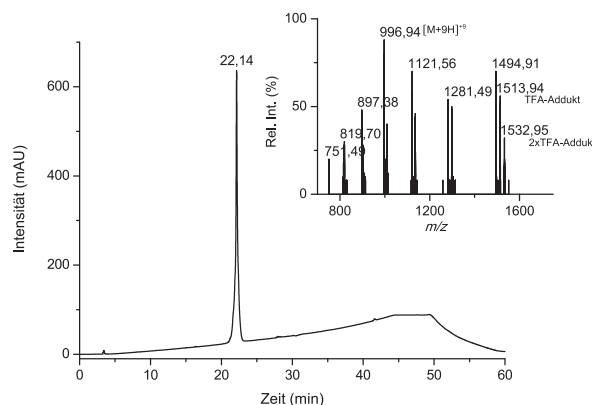
$t_R = 2.69$ min,

gefunden: 8 961.15 Da,

berechnet: 8 957.33 Da (8 962.93 Da Ø)

Sequenz (¹³C-Tyr₆₆ markiert)

Thz-YVSG FHPSD IEVDL LKNGE RIEKV EHSDL SFSKD WSFYLYYYTE FTPTE KDEYA
CRVNH VTLSQ PKIVK WDRDM

*Ausbeute*

60 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

$t_R = 22.14$ min (Reinheit >99 %)

LC-MS

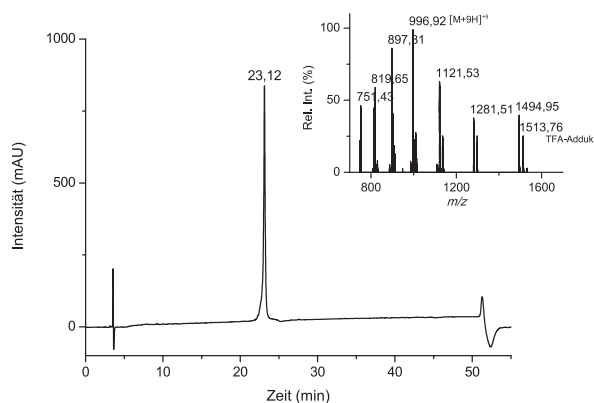
$t_R = 2.65$ min,

gefunden: 8 963.32 Da,

berechnet: 8 958.33 Da (8 963.93 Da Ø)

Sequenz (¹³C-Tyr₇₈ markiert)

Thz-YVSG FHPSD IEVDL LKNGE RIEKV EHSDL SFSKD WSFYLYYYTE FTPTE KDEYA
CRVNH VTLSQ PKIVK WDRDM

*Ausbeute*

30 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System C)

$t_R = 23.12$ min (Reinheit >99 %)

LC-MS

$t_R = 2.71$ min,

gefunden: 8 963.52 Da,

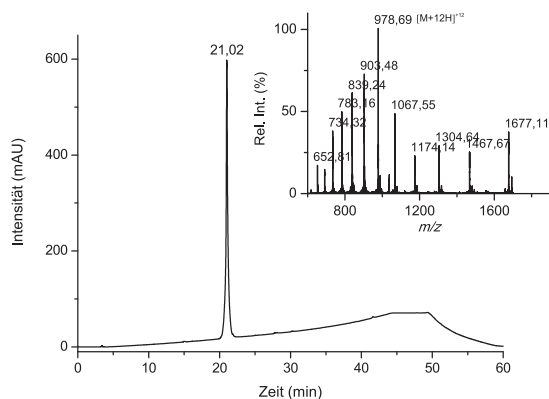
berechnet: 8 958.33 Da (8 963.93 Da Ø)

6.2.1.6. Zweite native chemische Ligation zum linearen β_2 -Mikroglobulin

Für die zweite NCL wurden zunächst 25.76 mg **B•C** (3 mmol, oder entsprechend die markierten Segmente) in 4 ml eines Puffers aus 6 M Gn•HCl, 0.2 M MeO-NH₂ in einer Konzentration von ca. 6 mg/ml gelöst. Bevor die Lösung für 4 h bei 37 °C gerührt wurde, fand unter Verwendung einer pH-Elektrode eine Justierung des pH-Wertes auf 4.0 mit HCl und NaOH statt. Anschließend wurden 18.32 mg TCEP•HCl (60 mmol, 20 Äq.) dazu gegeben und der pH-Wert auf 6.4 erhöht. Nach Zugabe von 2.3 mg A-SR (0.75 mmol, 0.25 Äq.) wurde die Lösung bei RT geschüttelt. In Abständen von zehn Minuten wurde noch acht Mal **A-SR** (Insges.: 2.25 Äq.) dazu gegeben, um nach weiteren zehn Minuten den pH-Wert auf 7.4 zu stellen. Die Lösungen wurden in diesem Zustand 1 h bei RT geschüttelt, um dann ein Vol-% Piperidin dazu zugeben und die Lösungen eine weitere Stunde bei RT zu belassen. Vor den präparativen RP-HPLCs (System 2) wurde nochmals mit zusätzlichen 18.0 mg TCEP•HCl (60 mmol, 20 Äq.) und einem pH-Wert von 7 für 1 h bei RT geschüttelt.

Sequenz (unmarkiert)

IQ RTP KI QVY SRHPA ENGKS NFLNC YVSGF HPSDI EVDLL KNGER IEKVE HSDL S
FSKDW SFYLL YYTEF TPTEK DEYAC RVNHV TLSQP KIVKW DRDM



Ausbeute (**ABC_1**)

14 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

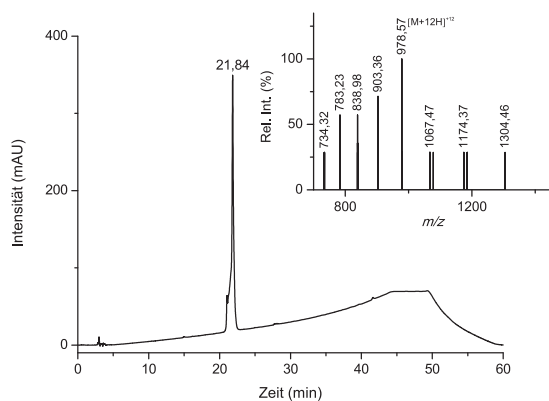
t_R = 21.02 min (Reinheit 98 %)

LC-MS

t_R = 2.53 min,

gefunden: 11 731.99 Da,

berechnet: 11 723.79 Da (11 731.21 Da Ø)



Ausbeute (**ABC_2**)

51 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

t_R = 21.84 min (Reinheit 93 %)

LC-MS

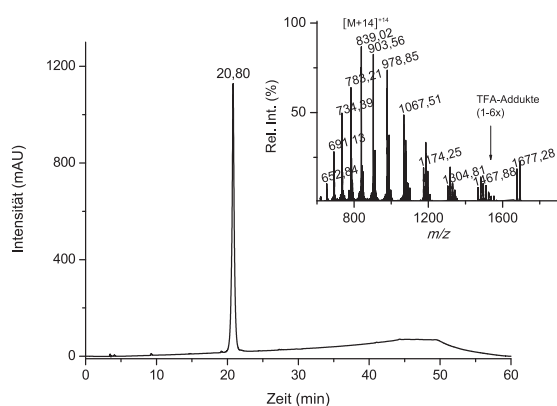
t_R = 2.66 min,

gefunden: 11 731.88 Da,

berechnet: 11 723.79 Da (11 731.21 Da Ø)

Sequenz (^{13}C -Tyr₆₆ markiert)

IQ RTP KIQVY SRHPA ENGKS NFLNC YVSGF HPSDI EVDLL KNGER IEKVE HSDLS
FSKDW SFYLL **Y**TEF TPTEK DEYAC RVNHV TLSQP KIVKW DRDM



Ausbeute (^{13}C -Tyr₆₆ **ABC_1**)

8 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

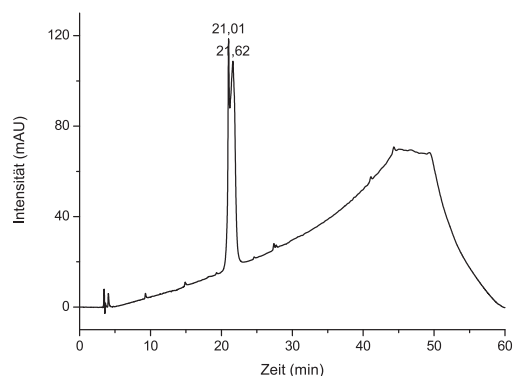
t_R = 20.80 min (Reinheit >99 %)

LC-MS

t_R = 2.59 min,

gefunden: 11 733.23 Da,

berechnet: 11 724.79 Da (11 732.21 Da Ø)



Ausbeute (^{13}C -Tyr₆₆ **ABC-Gemisch**)

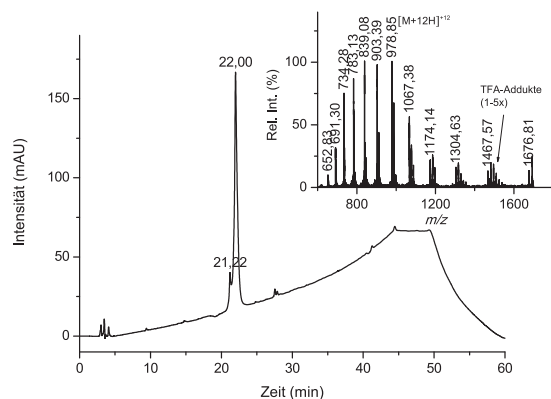
26 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

t_R = 21.01 & 21.62 min

LC-MS

t_R = 2.54 & 2.71 min,



Ausbeute (^{13}C -Tyr₆₆ **ABC_2**)

8 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

t_R = 22.00 min (Reinheit 93 %)

LC-MS

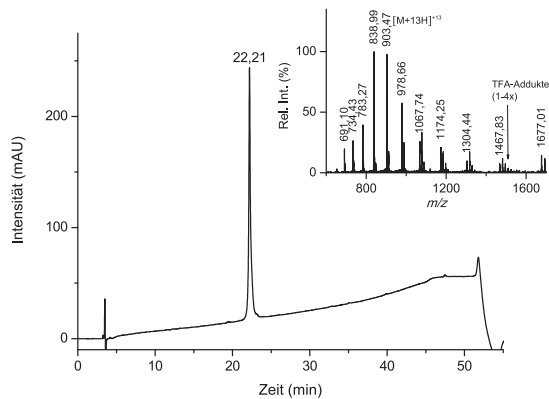
t_R = 2.72 min,

gefunden: 11 732.26 Da,

berechnet: 11 724.79 Da (11 732.21 Da Ø)

Sequenz (^{13}C -Tyr₇₈ markiert)

IQ RTP KIQVY SRHPA ENGKS NFLNC YVSGF HPSDI EVDLL KNGER IEKVE HSDLS
FSKDW SFYLL YYTEF TPTEK DEYAC RVNHV TLSQP KIVKW DRDM



Ausbeute (^{13}C -Tyr₇₈ **ABC_1**)

12 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

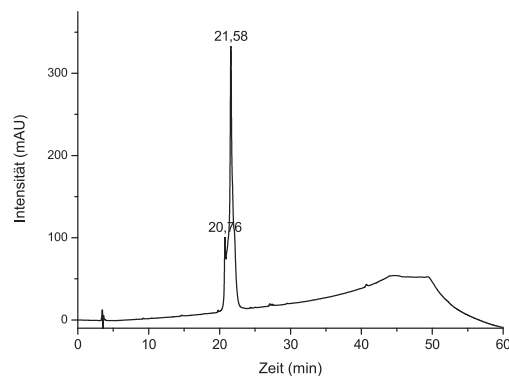
t_R = 22.21 min (Reinheit >99 %)

LC-MS

t_R = 2.60 min,

gefunden: 11 732.71 Da,

berechnet: 11 724.79 Da (11 732.21 Da Ø)



Ausbeute (^{13}C -Tyr₇₈ **ABC-Gemisch**)

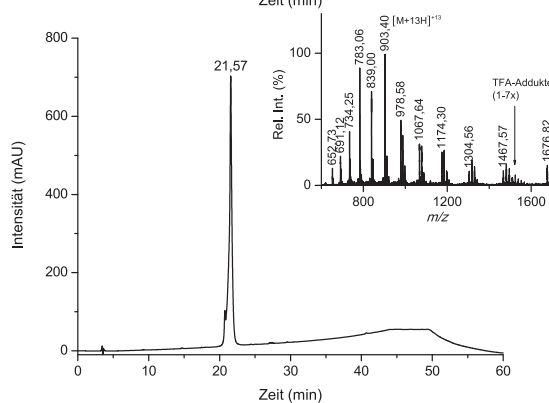
47 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

t_R = 20.76 & 21.58 min

LC-MS

t_R = 2.53 & 2.66 min,



Ausbeute (^{13}C -Tyr₇₈ **ABC_2**)

12 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

t_R = 21.57 min (Reinheit 94 %)

LC-MS

t_R = 2.61 min,

gefunden: 11 731.70 Da,

berechnet: 11 724.79 Da (11 732.21 Da Ø)

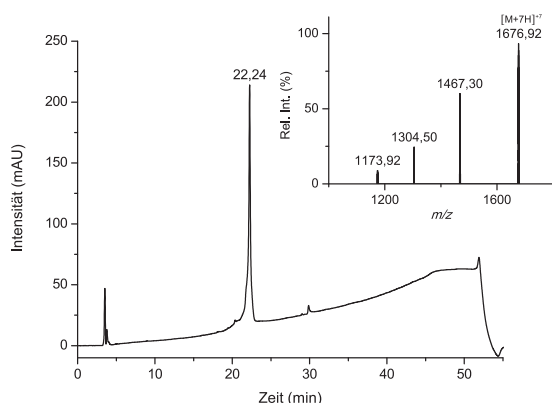
6.2.1.7. Faltung zur Tertiär-Struktur des β_2 -Mikroglobulins

9 mg der synthetisch dargestellten linearen β_2 -Mikroglobuline (0.8 mmol), welche nach der zweiten NCL als letztes eluierten (**ABC_2**), wurden in 408 μl eines Harnstoff-Puffers (8.3 M Harnstoff, 0.05 M NaCl, 0.02 M Tris•HCl, pH = 7.5)^[136] gelöst (20 mg **ABC_2**/ml) und 1 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde, nach der Zugabe von 16.7 mg reduziertem Glutathion (54 mmol, 70 Äq.) und der Einstellung des pH-Wertes auf 7.0, weitere 2 h bei RT geschüttelt. Diese Lösungen wurden unter Rühren tropfenweise zum Faltungs-Puffer (0.5 M L-Arginin, 0.025 M EDTA, Endkonz. 5 mM GSH, 0.5 mM GSSG, 0.1 M Tris•HCl, pH = 7.5)^[136] zugegeben. Bevor die Mischungen unter moderatem Rühren in einen Kühlraum

(8 °C) gestellt wurden, wurden die Proben für eine weitere Stunde bei RT belassen. Nach fünf Tagen wurde erneut das Glutathion-Redoxsystem (56 mg GSH, 11 mg GSSG) zur Faltungslösung gegeben und der pH-Wert auf 7.5 justiert. 100 mg GSSG wurden nach weiteren vier Tagen hinzu gegeben und die Lösung nun bei RT gerührt. Die oxidierten, gefalteten β_2 -Ms wurden per RP-HPLC (System 2) nach zusätzlichen zwölf Tagen aufgereinigt.

Sequenz (unmarkiert)

IQ RTP KIQVY SRHPA ENGKS NFLNC YVSGF HPSDI EVDLL KNGER IEKVE HSDLS
FSKDW SFYLL YYTEF TPTEK DEYAC RVNHV TLSQP KIVKW DRDM



Ausbeute

32 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

t_R = 22.24 min (Reinheit 98 %)

LC-MS

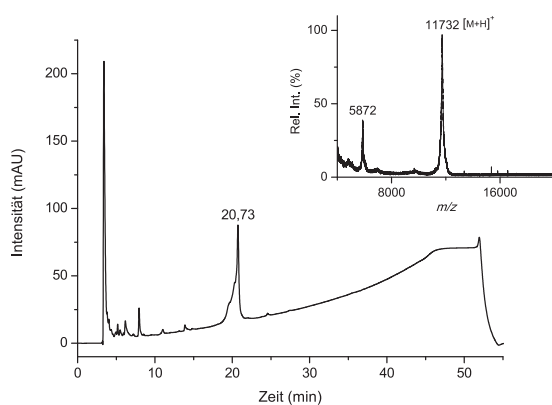
t_R = 2.95 min,

gefunden: 11 730.57 Da,

berechnet: 11 721.77 Da (11 729.19 Da Ø)

Sequenz (^{13}C -Tyr₆₆ markiert)

IQ RTP KIQVY SRHPA ENGKS NFLNC YVSGF HPSDI EVDLL KNGER IEKVE HSDLS
FSKDW SFYLL **Y**YTEF TPTEK DEYAC RVNHV TLSQP KIVKW DRDM



Ausbeute

30 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

t_R = 20.73 min (Reinheit >85 %)

LC-MS

t_R = 2.44 min (mit 0.1 % FA),

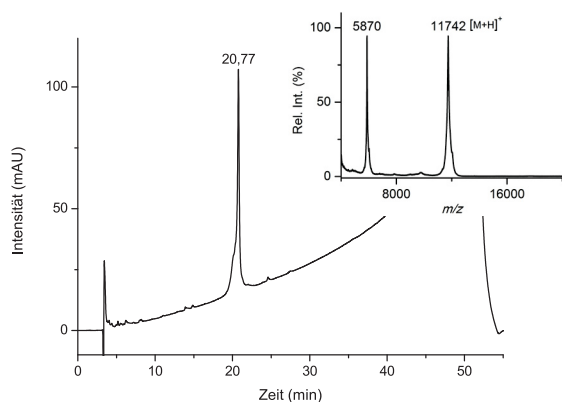
MALDI-MS

gefunden: 11 732 Da,

berechnet: 11 722.77 Da (11 730.19 Da Ø)

Sequenz (^{13}C -Tyr₇₈ markiert)

IQ RTP KI QVY SRHPA ENGKS NFLNC YVSGF HPSDI EVDLL KNGER IEKVE HSDL S
FSKDW SFYLL YYTEF TPTEK DEYAC RVNHV TLSQP KIVKW DRDM



Ausbeute

29 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

t_R = 20.77 min (Reinheit >87 %)

LC-MS

t_R = 2.35 min (mit 0.1 % FA),

MALDI-MS

gefunden: 11 742 Da,

berechnet: 11 722.77 Da (11 730.19 Da Ø)

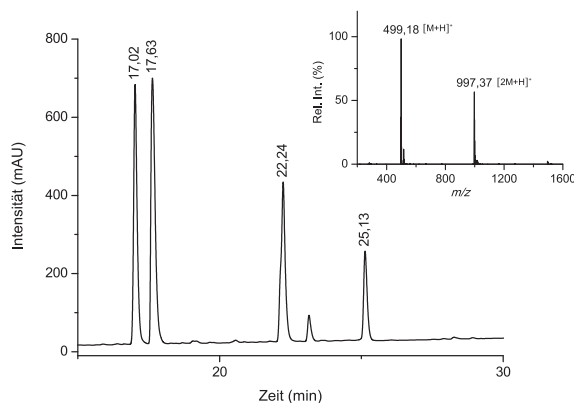
6.2.2. Synthesen der Modellpeptide für Experimente im Zusammenhang der Synthese vom β_2 -Mikroglobulin

6.2.2.1. Benzoyl-LN-p-Acetamidophenol (Bz-LN-SR)

Dieses Modell-Peptid wurde ebenfalls manuell auf 1 g ClTrt-Cl-Harz unter der Verwendung der Standard-Fmoc-Chemie synthetisiert, wobei mit einer Beladung des Harzes von 0.6 mmol gearbeitet wurde. Der N-Terminus wurde analog der Kupplung einer weiteren Aminosäure mit Benzoesäure durch eine Benzoyl-Gruppe geschützt. Die Harzabspaltung, Thioesterbildung und Seitenketten-Entschützung wurde wie beim Segment A-SR vollzogen. Der Peptid-Thioester wurde ohne Reinigung eingesetzt.

Sequenz

Benzoyl-LN-Aatp



weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

t_R = 22.24 min (Reinheit 20 %)

Verunreinigungen

Aatp (t_R = 17.02 min, 26 %), DIC-Aatp-

Addukt (t_R = 17.63 min, 32 %), Aatp-Dimer

(t_R = 25.13 min, 9 %)

LC-MS

t_R = 2.73 min,

gefunden: 498.17 Da,

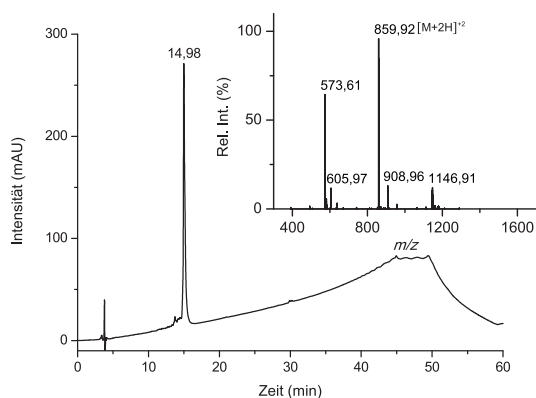
berechnet: 498.45 Da (498.59 Da Ø)

6.2.2.2. Modell-Peptide (1) bis (6) für intramolekulare Zyklisierungs-Untersuchungen (M(1-6)-SR)

Wie **A-SR** wurden die Modell-Peptide (1) bis (6) per automatisierter Parallelsynthese am Syro II auf jeweils 250 mg C1Trt-Cl-Harz unter Nutzung der Fmoc-Strategie synthetisiert. Der N-Terminus am Serin wurde anschließend acetyliert (5.2 μ l, 0.06 mmol, 1.1 Äq. Acetanhydrid; 17.1 μ l, 0.1 mmol, 2 Äq. DIPEA; DMF; 30 min, RT). Die Harzabspaltung, Thioesterbildung und Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen wurde, wie für das Segment **A-SR** beschrieben, durchgeführt. Die Peptid-Modelle (1) und (3) wurden am präparativen System 7, das Modell (2) am System 2 und die anderen Modelle am System 5 aufgearbeitet.

M1-SR

Acetyl-SRHP AENGK SNFLA-Aatp



Ausbeute

10 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

t_R = 14.98 min (Reinheit >99 %)

LC-MS

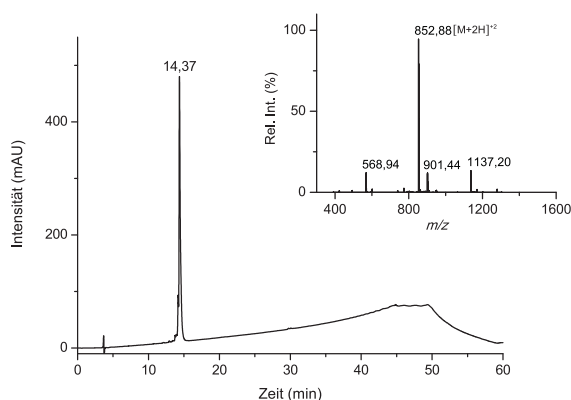
t_R = 2.27 min,

gefunden: 1 717.82 Da,

berechnet: 1 717.77 Da (1 718.70 Da Ø)

M2-SR

Acetyl-SRHP AENG SNFLN-Aatp



Ausbeute

86 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

t_R = 14.37 min (Reinheit 97 %)

LC-MS

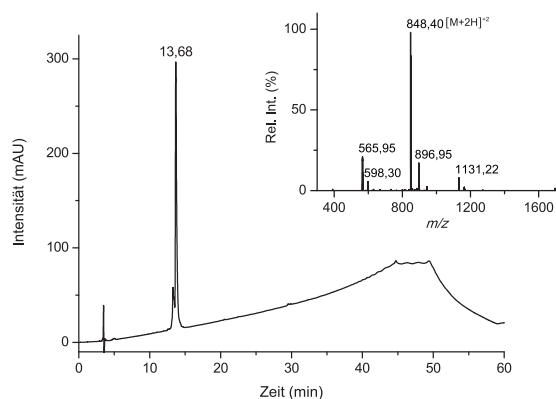
t_R = 2.23 min,

gefunden: 1 703.77 Da,

berechnet: 1 703.71 Da (1 704.62 Da Ø)

M3-SR

Acetyl-SRAP AENGK SNFLN-Aatp



Ausbeute

60 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

$t_R = 13.68$ min (Reinheit 92 %)

LC-MS

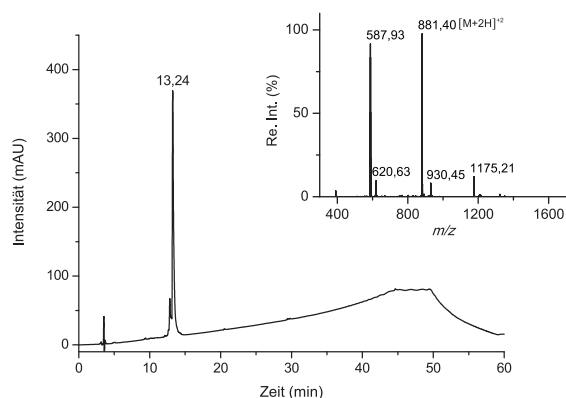
$t_R = 2.20$ min,

gefunden: 1 694.81 Da,

berechnet: 1 694.75 Da (1 695.66 Da Ø)

M4-SR

Acetyl-SRHP AENGK SNFLN-Aatp



Ausbeute

75 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

$t_R = 13.24$ min (Reinheit 92 %)

LC-MS

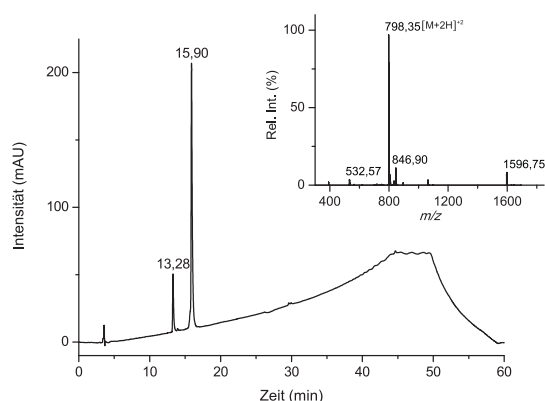
$t_R = 2.14$ min,

gefunden: 1 760.76 Da,

berechnet: 1 760.80 Da (1 761.75 Da Ø)

M5-SR

Acetyl-SRAP AENG A SNFLA-Aatp



Ausbeute

"112 %", weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

$t_R = 15.90$ min (Reinheit 85 %)

Verunreinigung

DIC-Aatp-Addukt ($t_R = 13.28$ min, 15 %)

LC-MS

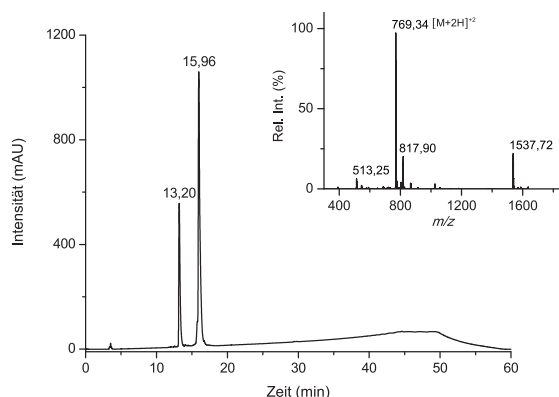
$t_R = 2.52$ min,

gefunden: 1 595.21 Da,

berechnet: 1 594.71 Da (1 595.56 Da Ø)

M6-SR

Acetyl-SRAP AANGA SNFLA-Aatp

*Ausbeute*

"105 %", weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

$t_R = 15.96$ min (Reinheit 71 %)

Verunreinigung

DIC-Aatp-Addukt ($t_R = 13.20$ min, 29 %)

LC-MS

$t_R = 2.53$ min,

gefunden: 1 536.70 Da,

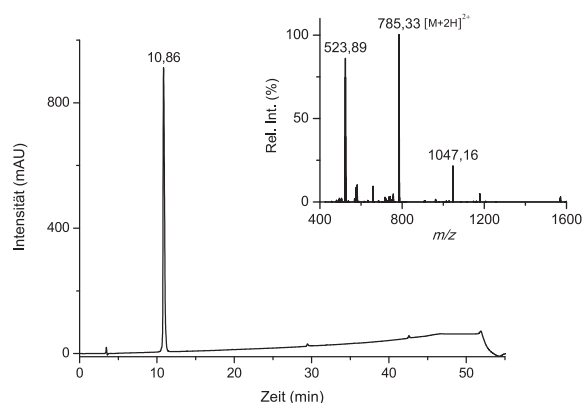
berechnet: 1 536.71 Da (1 537.53 Da Ø)

6.2.2.3. L-/D-Säuren der Modell-Peptide (1) bis (6) (M(1-6)-OH)

Die Säuren der Modell-Thioester, welche bezüglich der C-terminalen AS L- bzw. D-Isomerie aufweisen, wurden gemäß ihrer Thioester am Syro II per automatisierter SPPS gewonnen, manuell acetyliert und in der Abspaltungslösung (H₂O/TIPS/Phenol/TFA, 5/5/2/88) für 3 h bei RT gerührt^[150]. Die RP-HPLC Reinigungen wurden auf System 7 vollzogen.

M1-OH

Acetyl-SRHP AENGK SNFL-L-A-Aatp

*Ausbeute*

10 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

$t_R = 10.86$ min (Reinheit >99 %)

LC-MS

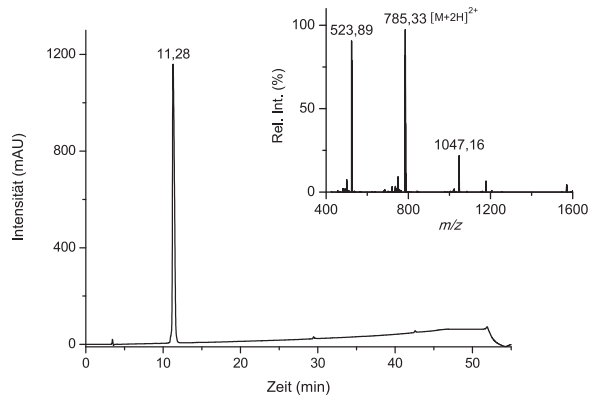
$t_R = 1.76$ min,

gefunden: 1 568.65 Da,

berechnet: 1 568.77 Da (1 569.70 Da Ø)

m1-OH

Acetyl-SRHP AENGK SNFL-D-**A**-Aatp



Ausbeute

34 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

$t_R = 11.28$ min (Reinheit >99 %)

LC-MS

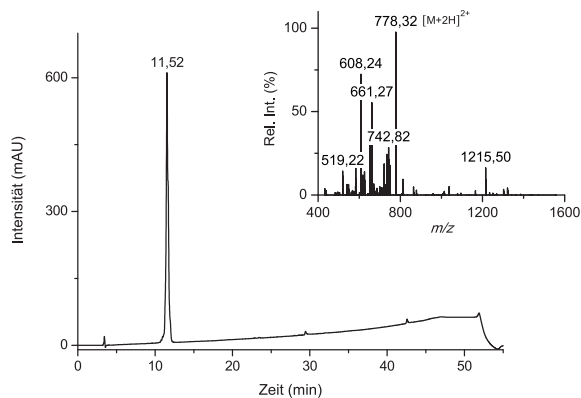
$t_R = 1.81$ min,

gefunden: 1 568.65 Da,

berechnet: 1 568.77 Da (1 569.70 Da Ø)

M2-OH

Acetyl-SRHP AENG**A** SNFL-L-N-Aatp



Ausbeute

4 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

$t_R = 11.52$ min (Reinheit >99 %)

LC-MS

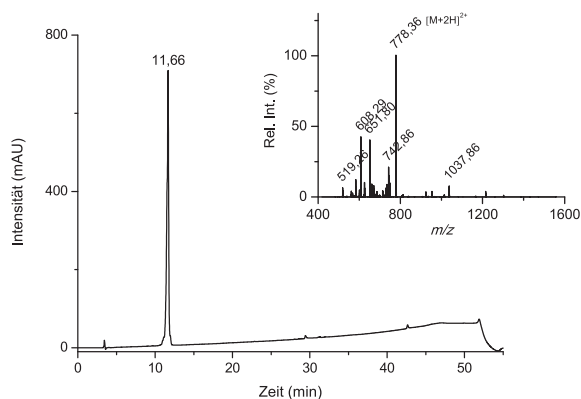
$t_R = 1.83$ min,

gefunden: 1 554.63 Da,

berechnet: 1 554.72 Da (1 555.63 Da Ø)

m2-OH

Acetyl-SRHP AENG**A** SNFL-D-N-Aatp



Ausbeute

2 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

$t_R = 11.66$ min (Reinheit >99 %)

LC-MS

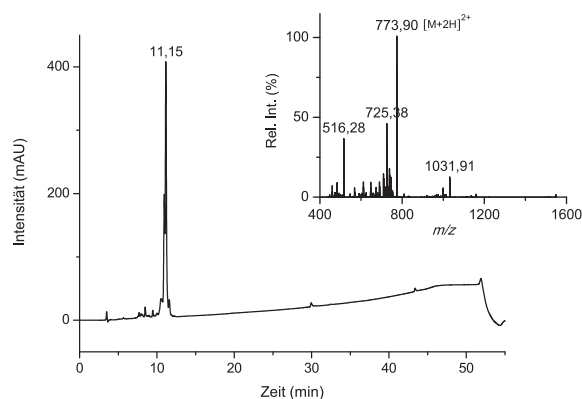
$t_R = 1.87$ min,

gefunden: 1 554.73 Da,

berechnet: 1 554.72 Da (1 555.63 Da Ø)

m3-OH

Acetyl-SRAP AENGK SNFL-D-N-Aatp

*Ausbeute*

8 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

 $t_R = 11.15$ min (Reinheit 73 %)

LC-MS

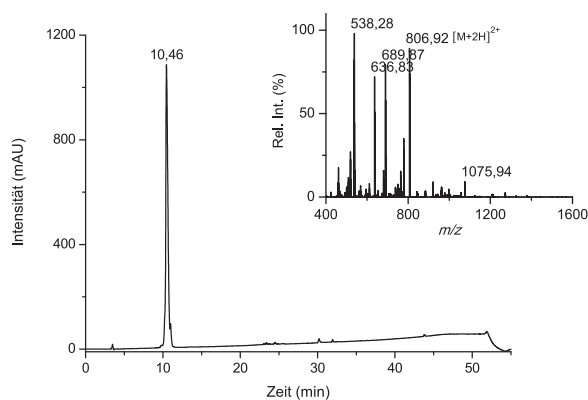
 $t_R = 1.75$ min,

gefunden: 1 545.80 Da,

berechnet: 1 545.75 Da (1 546.66 Da Ø)

M4-OH

Acetyl-SRHP AENGK SNFL-L-N-Aatp

*Ausbeute*

7 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

 $t_R = 10.46$ min (Reinheit >99 %)

LC-MS

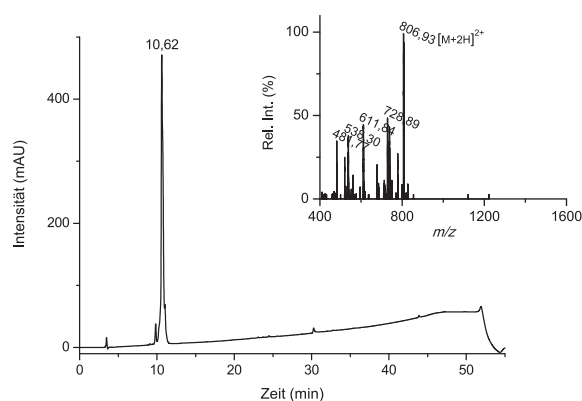
 $t_R = 1.65$ min,

gefunden: 1 611.82 Da,

berechnet: 1 611.78 Da (1 612.72 Da Ø)

m4-OH

Acetyl-SRHP AENGK SNFL-D-N-Aatp

*Ausbeute*

3 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

 $t_R = 10.62$ min (Reinheit 97 %)

LC-MS

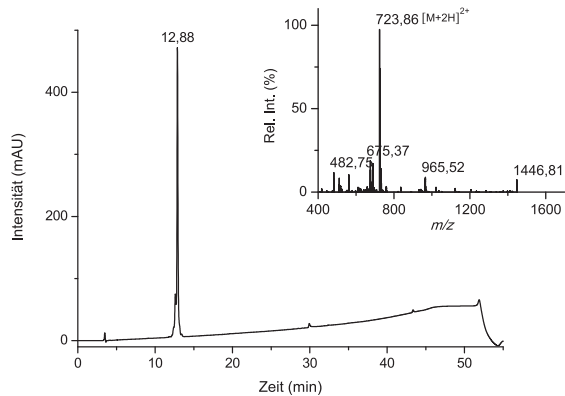
 $t_R = 1.82$ min,

gefunden: 1 611.84 Da,

berechnet: 1 611.78 Da (1 612.72 Da Ø)

M5-OH

Acetyl-SRAP AENG A SNFL-L-A-Aatp



Ausbeute

10 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

t_R = 12.88 min (Reinheit 81 %)

LC-MS

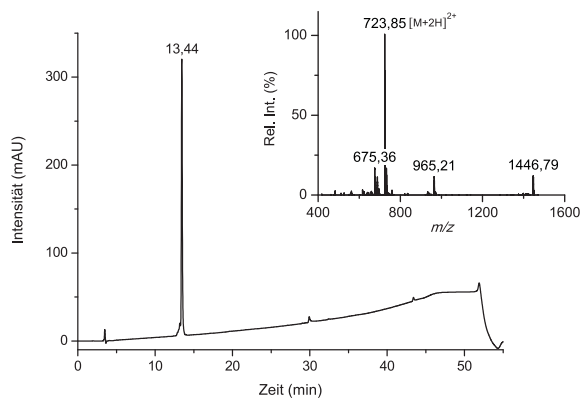
t_R = 2.00 min,

gefunden: 1 445.58 Da,

berechnet: 1 445.69 Da (1 446.54 Da Ø)

m5-OH

Acetyl-SRAP AENG A SNFL-D-A-Aatp



Ausbeute

16 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

t_R = 13.44 min (Reinheit >99 %)

LC-MS

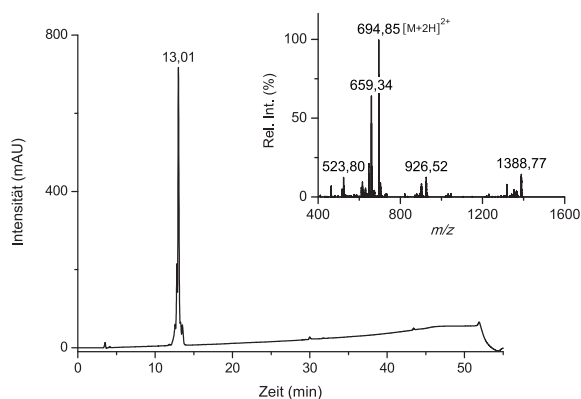
t_R = 2.08 min,

gefunden: 1 445.73 Da,

berechnet: 1 445.69 Da (1 446.54 Da Ø)

M6-OH

Acetyl-SRAP AANG A SNFL-L-A-Aatp



Ausbeute

6 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

t_R = 13.01 min (Reinheit 85 %)

LC-MS

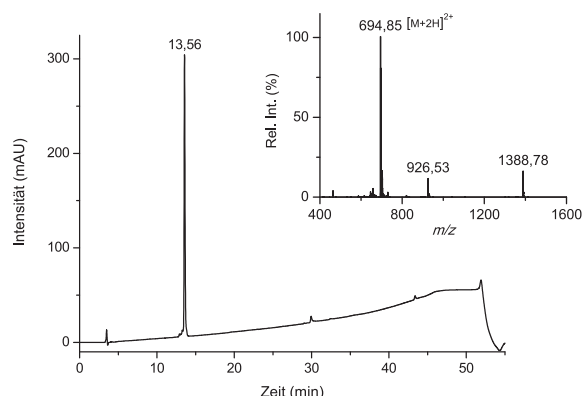
t_R = 1.97 min,

gefunden: 1 387.72 Da,

berechnet: 1 387.68 Da (1 388.50 Da Ø)

m6-OH

Acetyl-SRAP AANGA SNFL-D-A-Aatp

*Ausbeute*

25 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B) $t_R = 13.56$ min (Reinheit >99 %)*LC-MS* $t_R = 2.07$ min,

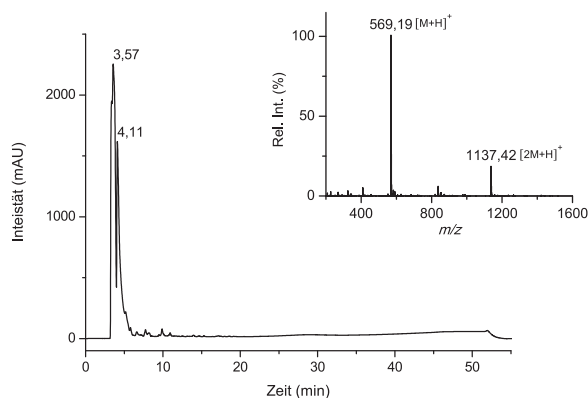
gefunden: 1 387.73 Da,

berechnet: 1 387.68 Da (1 388.50 Da Ø)

6.2.2.4. L-/D-Segmente als Standards zum Vergleich mit dem Fragment nach dem Chymotrypsin-Verdau vom ABC-Gemisch

Die Segmente LNCY und LnCY wurden am Syro II per automatisierter paralleler SPPS nach Fmoc-Strategie synthetisiert. Die Harz-Abspaltung fand manuelle mit (H₂O/TIPS/Phenol/TFA, 5/5/2/88) über 1 h bei RT statt^[150]. Abschließend wurden die Segmente mit Iodacetamid alkyliert (siehe unten) und wurden ohne Aufreinigung eingesetzt.

LNC(Carbamidomethyl)Y

*Ausbeute*

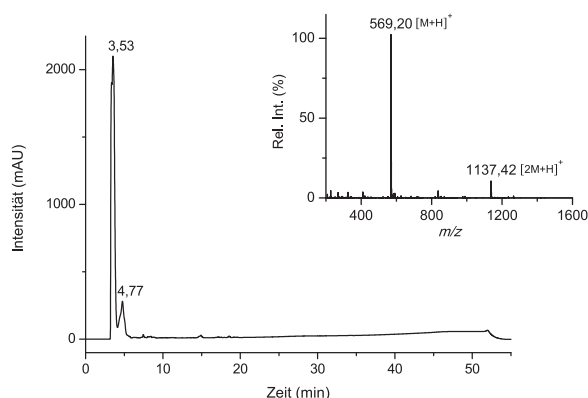
29 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B) $t_R = 3.57$ min (Reinheit 67 %)*LC-MS* (mit 0.1 % FA) $t_R = 1.35$ min,

gefunden: 568.18 Da,

berechnet: 568.23 Da (568.65 Da Ø)

LnC(Carbamidomethyl)Y

*Ausbeute*

21 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B) $t_R = 3.53$ min (Reinheit 86 %)*LC-MS* (mit 0.1 % FA) $t_R = 1.32$ min,

gefunden: 568.19 Da,

berechnet: 568.23 Da (568.65 Da Ø)

6.2.2.5. Experimente im Zusammenhang der Synthese vom β_2 -Mikroglobulin

Bedingungen für die NCL, welche zu Nebenreaktionen führten

Das Segment **BC** wurde mit dem Segment **A-SR** (1.2 Äq.) und einem Überschuss an TCEP•HCl im Ligations-Puffer (6 M Gn•HCl, 0.2 M Na₂HPO₄, pH = 7.4) gelöst (10 mg Peptid/ml) und bei einem pH-Wert von 7.4 legiert^{[63][64]}. Der Reaktionsverlauf wurde unter Zuhilfenahme von LC-MS und RP-HPLC beobachtet (nach 5, 60 & 90 min, anal. System A).

Reduktion vom oxidierten Methionin mit Trimethylsilylbromid und Ethandithiol

Für die Reduktion wurden ca. 2 mg Protein in 2 ml wasserfreiem DCM in einem mit einem Septum verschlossenen Kolben gelöst. Dazu wurden 31.4 µl (Endkonz. 0.2 M) Ethandithiol und anschließend 26 µl (Endkonz. 0.1 M) Trimethylsilylbromid unter rühren gegeben und für 15 min bei RT gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in eisgekühltem Ether gefällt. Das reduzierte Protein wurde zentrifugiert (5 000 x g, 5 min) und zwei Mal mit Ether gewaschen. Abschließend wurde das Protein-Pellet in einem Gemisch von *tert*-Butylalkohol und Wasser (4:1) aufgenommen und lyophilisiert.^[114]

Reduktion mit TCEP•HCl

Reduktionen mit TCEP•HCl wurden, wenn sie nicht genauer beschrieben wurden, mit einem Überschuss an TCEP•HCl bei einem pH-Wert von ca. 7 über 1 h bei RT ausgeführt.

Alkylierung mit Iodacetamid nach vorheriger Reduktion mit Dithiothreitol von Thiol-Gruppen

Die Reduktionen von Schwefel-Verbindungen mit Dithiothreitol (DTT) wurden in einem 100 mM ABC-Puffer mit einer Protein-Konzentration von 2 mg/ml und 1 M DTT-Lösung bei 25 °C über 30 Minuten durchgeführt.^[115]

Anschließend fand die Alkylierung mit einer 20 %-igen Iodacetamid-Lösung ebenfalls bei 25 °C über 30 min statt.^[115]

Tryptische Verdaue

Die Verdaue mit Trypsin wurden nach dem Standard-Protokoll von Promega^[153] durchgeführt. Die Verdaue der Segmente des β_2 -Mikroglobulins, der verschiedenen linearen Formen des β_2 -Mikroglobulins und des Hauptnebenproduktes von Segment **A-SR** nach der zweiten Ligation wurden über Nacht durchgeführt. Alle anderen Verdaue wurden nach 1 h abgestoppt.

*Untersuchungen des **ABC**-Produkt-Gemisches und des rekombinanten β_2 -Mikroglobulins in verschiedenen Lösungsmitteln*

Sämtliche Untersuchungen fanden mit einer Konzentration von 1 mg/ml statt. Die Struktur-Untersuchungen mit Gn•HCl fanden in 6 M Gn•HCl, mit Harnstoff in 8 M Harnstoff, mit HFIP in reinem HFIP und mit TFA in reinem TFA statt. Für die pH-Wert-Untersuchungen wurde für den pH-Bereich <2 eine Lösung von 0.1 M HCl, für den pH-Bereich >9 eine Lösung von 0.1 M NaOH und für den pH = 5 wurden die beiden erstgenannten auf diesen pH-Wert hin titriert. Der Versuch im Basischen mit EDTA wurde mit zusätzlich 50 mM EDTA durchgeführt.

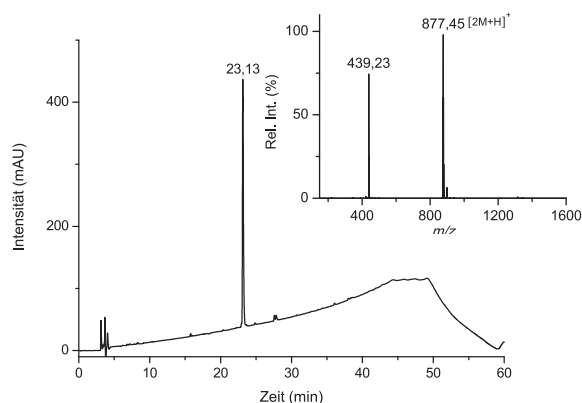
*Experimente mit **A-SR***

A-SR wurde den obigen NCL-Bedingungen^[64] ohne Anwesenheit von **BC** mit einer Konzentration von 1 mg/ml ausgesetzt. Hierbei wurden drei verschiedene pH-Werte (5.4, 6.4, 7.4) eingestellt und der Verlauf mittels LC-MS beobachtet (nach 0, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 & 60 min).

Experimente mit Benzoyl-LN-Aatp

Das Modell Bz-LN-SR ("100 mg, 0.2 mmol") wurde mit 218 μ l Benzylamin (2 mmol, "10 Äq.") unter den obigen Konditionen für die NCL bei einem pH-Wert von 8.4 über Nacht bei RT umgesetzt und mittels anal. RP-HPLC (System A) und LC-MS analysiert. Die Reinigung der Benzoyl-LN-Benzylamid Produkte fand auf dem präparativen RP-HPLC System 7 statt.

Benzoyl-LN-Benzylamid I (früher eluierendes Produkt)



weißer Feststoff

RP-HPLC (System A)

$t_R = 23.13$ min (Reinheit >99 %)

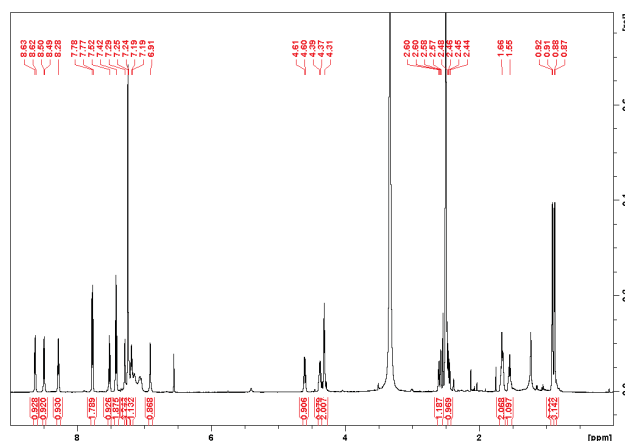
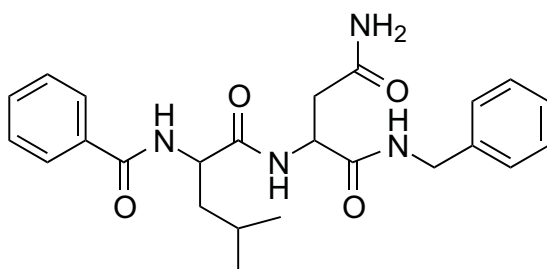
LC-MS

$t_R = 2.87$ min,

gefunden: 438.22 Da,

berechnet: 438.23 Da (438.53 Da Ø)

Strukturformel

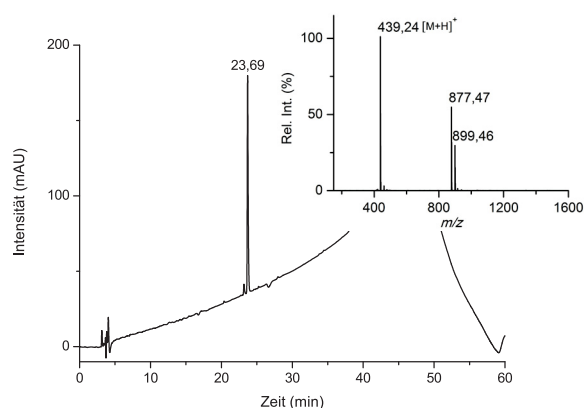


¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO), δ [ppm]

8.62 (d, 1 H, J = 6.8 Hz; Leu-NH), 8.49 (d, 1 H, J = 8.3 Hz; Asn-NH), 8.28 (t, 1 H, J = 6.1 Hz; Benzylamid-NH), 7.77 (pseudo-d, 2 H, J = 7.8 Hz; *o*-Aryl-CH), 7.52 (pseudo-t, 1 H, J = 7.4 Hz; *p*-Aryl-CH), 7.42 (pseudo-t, 2 H, J = 7.7 Hz; *m*-Aryl-CH), 7.29 (s, 1 H; Asn-NH_{2/A}), 7.26-7.22 (m, 4 H; *o*/*m*-Aryl-CH), 7.20-7.17 (m, 1 H; *p*-Aryl-CH), 6.91 (s, 1 H; Asn-NH_{2/B}), 4.60 (d x d x d, 1 H, J = 8.8, 8.2, 5.1 Hz; Asn-CH _{α}), 4.38 (d x d x d, 1 H, J = 8.5, 6.5, 6.5 Hz; Leu-CH _{α}), 4.35-4.27 (m, 2 H; Benzylamid-CH _{α}), 2.59 (d x d, 1 H, J = 15.4, 5.1 Hz; Asn-CH _{$\beta/1$}), 2.46 (d x d, 1 H, J = 15.4, 8.2 Hz; Asn-CH _{$\beta/2$}), 1.70-1.61 (m, 1 H; Leu-CH _{$\beta/1$}), 1.70-1.61 (m, 1 H; Leu-CH _{γ}), 1.58-1.51 (m, 1 H; Leu-CH _{$\beta/2$}), 0.91 (d, 3 H, J = 6.1 Hz; Leu-CH_{3/A}), 0.88 (d, 3 H, J = 6.3 Hz; Leu-CH_{3/B})

¹³C-NMR (600 MHz, d₆-DMSO, aus HMQC & HMBC), δ [ppm]

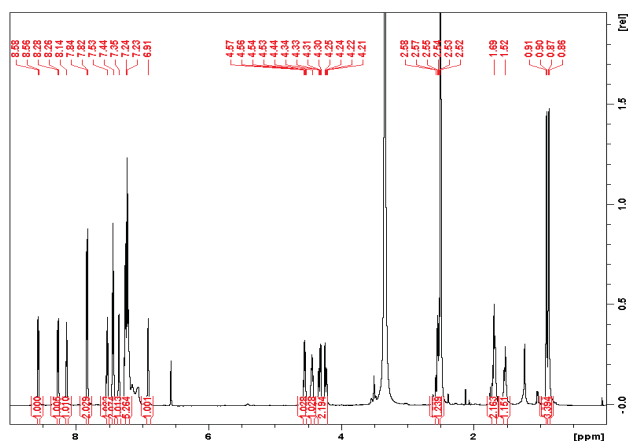
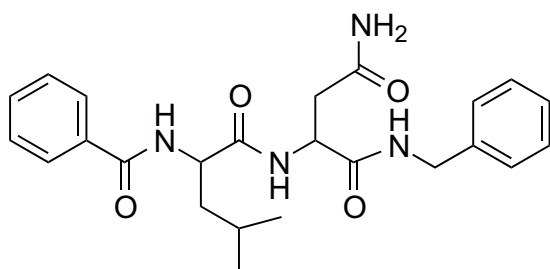
172.2 (1 C, Leu-C=O), 171.2 (1 C, Asn-(C=O)-NH₂), 170.8 (1 C, Asn-C=O), 167.0 (1 C, Benzoyl-C=O), 139.1 (1 C, Benzylamid-*p*-Aryl-CH), 133.7 (1 C, Aryl-C), 131.1 (1 C, *p*-Aryl-CH), 127.8 (2 C, Benzylamid-*m*/*o*-Aryl-CH), 127.8 (2 C, *m*-Aryl-CH), 126.6 (2 C, Benzylamid-*m*/*o*-Aryl-CH), 126.3 (1 C, Benzylamid-*p*-Aryl-CH), 52.4 (1 C, Leu-CH _{α}), 49.7 (1 C, Asn-CH _{α}), 41.9 (1 C, Benzylamid-CH _{α}), 39.5 (1 C, Leu-CH _{β}), 36.6 (1 C, Asn-CH _{β}), 24.0 (1 C, Leu-CH _{γ}), 22.6 & 21.6 (2 C, Leu-CH₃)

Benzoyl-LN-Benzylamid II (später eluierendes Produkt)

weißer Feststoff

RP-HPLC (System A) $t_R = 23.69$ min (Reinheit >99 %)*LC-MS* $t_R = 2.93$ min,

gefunden: 438.23 Da,

berechnet: 438.23 Da (438.53 Da \emptyset)*Strukturformel* $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, d_6 -DMSO), δ [ppm]

8.57 (d, 1 H, $J = 7.4$ Hz; Leu-NH), 8.27 (d, 1 H, $J = 7.8$ Hz; Asn-NH), 8.14 (pseudo-t, 1 H, $J = 5.8$ Hz; Benzylamid-NH), 7.83 (pseudo-d, 2 H, $J = 7.6$ Hz; *o*-Aryl-CH), 7.53 (pseudo-t, 1 H, $J = 7.2$ Hz; *p*-Aryl-CH), 7.44 (pseudo-t, 2 H, $J = 7.5$ Hz; *m*-Aryl-CH), 7.35 (s, 1 H; Asn-NH_{2A}), 7.27-7.20 (m, 5 H; Aryl-CH), 6.91 (s, 1 H; Asn-NH_{2B}), 4.55 (q, 1 H, $J = 6.9$ Hz; Asn-CH _{α}), 4.46-4.42 (m, 1 H; Leu-CH _{α}), 4.32 (d x d, 1 H, $J = 6.3, 15.3$ Hz; Benzylamid-CH _{α}), 4.23 (d x d, 1 H, $J = 5.6, 15.3$ Hz; Benzylamid-CH _{α}), 2.59-2.49 (m, 2 H; Asn-CH _{β}), 1.72-1.66 (m, 1 H; Leu-CH _{β}), 1.54-1.50 (m, 1 H; Leu-CH _{β}), 0.90 (d, 3 H, $J = 6.2$ Hz; Leu-CH_{3A}), 0.87 (d, 3 H, $J = 6.3$ Hz; Leu-CH_{3B})

 $^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz, d_6 -DMSO, aus HMQC & HMBC), δ [ppm]

172.0 (1 C, Leu-C=O), 171.1 (1 C, Asn-(C=O)-NH₂), 170.7 (1 C, Asn-C=O), 166.9 (1 C, Benzoyl-C=O), 139.2 (1 C, Benzylamid-*p*-Aryl-CH), 133.9 (1 C, Aryl-C), 131.0 (1 C, *p*-Aryl-CH), 128.0 (1/2 C, Benzylamid-Aryl-CH), 127.9 (2 C, *m*-Aryl-CH), 126.8 (1/2 C, Benzylamid-Aryl-CH), 126.6 (1/2 C, Benzylamid-Aryl-CH), 52.0 (1 C, Leu-CH _{α}), 49.6 (1 C, Asn-CH _{α}), 41.8 (1 C, Benzylamid-CH _{α}), 39.7 (1 C, Leu-CH _{β}), 36.3 (1 C, Asn-CH _{β}), 24.1 (1 C, Leu-CH _{γ}), 22.8 & 21.61 (2 C, Leu-CH₃)

Experimente mit den Modell-Peptiden M(1-6)-SR

M(1-6)-SR wurden in 0.2 M Na_2HPO_4 -Puffer mit den pH-Werten 6.4, 7.4 und 8.4 gelöst (1 mg/ml). Die Nebenreaktionen wurden per LC-MS und analytischer RP-HPLC (System A) untersucht (nach 5 min, 60 min & >24 h). Für weitere Betrachtungen wurden ausgewählte Nebenprodukte, MX(-18) nochmals in obigen Puffer mit pH = 8.4 für 20 min generiert und aufgereinigt (System 1), mittels RP-HPLC analysiert (anal. System A bzw. B) und per LC-MS identifiziert. Anschließend wurden diese Nebenprodukte tryptisch verdaut und mit Hilfe von LC-MS und zum Teil durch MS/MS-Untersuchungen charakterisiert.

Experimente mit den L-/D-Säuren der Modell-Peptide M(1-6)-SR

M(1-6)-SR wurde in einer 0.2 M Na_2HPO_4 Lösung mit einem pH-Wert von 7.4 gelöst (1 mg/ml) und mittels analytischer RP-HPLC (System B) und LC-MS verfolgt (nach 5 min, 60 min & >24 h). Die dabei entstandenen Hydrolyseprodukte, die Säuren, wurden dann mit den entsprechenden L- und D-Säuren, welche einzeln und als Gemisch aufgetragen wurden, nachvollzogen.

Derivatisierung für stereochemische Untersuchungen von AS

Für die Hydrolyse der Peptide^{[129][156]} wurden ca. 5 mg Peptid in 8 ml 6 M HCl gelöst und in einem verschlossenem Gefäß für 24 h auf 110 °C erhitzt. Nach der Hydrolyse wurde die HCl im Vakuum komplett entfernt.

Die Derivatisierung zum N,O-TFA-Aminosäure-Methyl-Ester^[128] wurde mit 1 mg je Standard oder dem Hydrolysat aus 5 mg Peptid in 1.5 ml einer 3 M HCl in Methanol bei 40 °C für 60 min in einem verschlossenem Gefäß durchgeführt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Reagenz mit einem schwachen Stickstoff-Fluss komplett entfernt. Die Proben wurden dann mit 1.0 ml von 20 % (V/V) Trifluoracethanhydrid in DCM für 2 h bei RT in einem geschlossenen Gefäß behandelt. Das Lösungsmittel und die Reagenzien wurden mit einem schwachen Stickstoff-Fluss verdampft und in einem angemessenen Volumen DCM aufgenommen und in die GC injiziert.

Thermische Denaturierung

Die Studien der thermischen Denaturierung der Proteine wurden mittels FTIR-Spektroskopie durchgeführt. Hierfür wurden die Proteine in einem D_2O -Puffer mit 10 mM Natrium-Cacodylat bei einem pD von 7 zunächst bei 20 °C gemessen, anschließend in 2-3 min bis zum nächsten Messpunkt, 65 °C, aufgeheizt und schließlich innerhalb 2-3 min auf die Endtemperatur von 85 °C geheizt, wo der letzte Messwert aufgenommen wurde.

Aggregations-Untersuchungen

Die Aggregation der Proteine wurde ebenfalls FTIR-analytisch verfolgt. Hierfür wurden die Proteine in DCl gelöst und zur Aggregation mit 0.2 M NaCl versetzt. Die Messungen fanden vor Zugabe, 3 min und 18 h nach Zugabe des Salzes statt.

Faltungs-Versuche

Die literaturbekannten Faltungs-Bedingungen^[136] umfassten eine Denaturierung in einem 8.3 M Harnstoff-Puffer und anschließende Zugabe in den Faltungs-Puffer (500 mM Arginin, 25 mM EDTA, 5 mM GSH, 0.5 mM GSSG, 100 mM Tris•HCl, pH 7.5) mit einer Protein-Konzentration von 1 mg/40 ml. Die Faltung fand bei 4 °C über drei Tage statt und wurde anschließend aufgereinigt. Es wurden Untersuchungen hinsichtlich der Temperatur (RT vs. 4 °C) durchgeführt.

6.2.3. Synthese der CRF1-Mimetika

6.2.3.1. Biosynthese des Rezeptor-N-Terminus (ECD1)

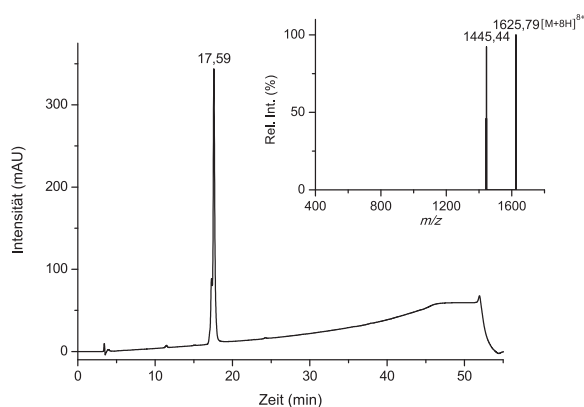
Für die Übernachtskultur für die Biosynthese des N-Terminus wurden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit dem Plasmid pET-CRF1R-NT-LPKTGGR transformiert und in 20 ml LB-Medium (10.0 g/l Trypton, 5.0 g/l Hefeextrakt, 10.0 g/l NaCl, pH 7.0±0.2) mit Ampicillin (Endkonz. 100 µg/ml) und 200 µl Bakterien-Glycerol-Stammkultur (Kryokultur) bei 37 °C über Nacht inkubiert. Diese Bakteriensuspension wurde für die Hauptkultur in 2 l LB-Medium mit Ampicillin (Endkonz. 100 µg/ml) bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 0.5-0.7 ebenfalls bei 37 °C inkubiert. Zum Start der Expression wurde IPTG (Endkonz. 0.5 mol/l) zugegeben und nach 3-4 h betrug die Expressionsausbeute 30-35 mg/l Medium. Das Ernten der Zellen fand durch Zentrifugation (15 min, 4 200 x g, 4 °C) und Abdekandieren des Überstandes statt. Aufnahme des Zellpellet fand anschließend im Lysis-Puffer (20 mM Tris•HCl, 0.1 % Triton X-100, pH 8.0) statt, um dann im Hochdruckhomogenisator die Zellen aufzuschließen. Der Aufschluss wurde zentrifugiert (20 min, 20 000 x g, 4 °C) und das aus Inclusionbodies bestehende Pellet in 12 ml Puffer (5 M Gn•HCl, 20 mM Tris•HCl, pH 7.5) aufgenommen. Das Ganze wurde mit Hilfe von Ultraschall im Eisbad homogenisiert und abermals zentrifugiert (20 min, 20 000 x g, 4 °C), um anschließend den Überstand auf eine Konzentration von 1-2 mg Protein/ml zu verdünnen. 20 mg Protein wurden mit TCEP•HCl für 2 h bei RT reduziert und über Nacht bei 8 °C gegen einen Denaturierungs-Puffer (5 M Gn•HCl, 1 mM EDTA, pH 3; MWCO 3 500) dialysiert. Anschließend wurde der Überstand auf eine Konzentration von 0.5 mg Protein/ml und einen pH von 7.5 gebracht (6 M Gn•HCl, 1 M EDTA). Die Faltung wurde durch dreitägige

Dialyse gegen einen wässrigen Puffer (1 M Arginin, 100 mM Tris•HCl, 1 mM EDTA, 1 mM GSH, 1 mM GSSG, pH 7.5, 10 °C; MWCO 3 500) durchgeführt. Die abschließende präparative Reinigung fand auf System 6 statt.^{[65][66]}

Die korrekte Ausbildung der Disulfid-Brücken wurde mittels chymotryptischen Verdaus bestätigt. Hierfür wurden zu 40 µl 50 mM ABC-Puffer mit einem pH-Wert von 7.5 3.01 µl einer 0.5 mM wässrigen Lösung des N-Terminus und 1.0 µl Chymotrypsin (0.5 g/l in 1 M HCl) gegeben und anschließend für 19 h bei RT geschüttelt. Der Verdau von 15 µl wurde durch den Zusatz von weiteren 15 µl einer 0.6 %-igen TFA Lösung abgestoppt und anschließend per LC-MS analysiert.^{[65][66]}

Sequenz

MRGSH HHHHH GSLQD QRCEN LSLTS NVSGL QCNAS VDLIG TCWPR SPAGQ LVVRP
CPAFF YGVRY NTTNN GYREC LANGS WAARV NYSEC QEILN EEKKS KVHYH VAVLP
KTGGR R



Ausbeute

28 % (bezogen auf ungefaltetes Protein),
weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

$t_R = 17.59$ min (Reinheit 82 %)

LC-MS

$t_R = 2.66$ min,

gefunden: 12 999.07 Da,

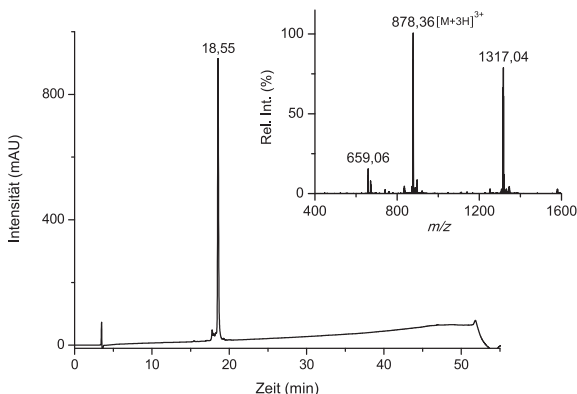
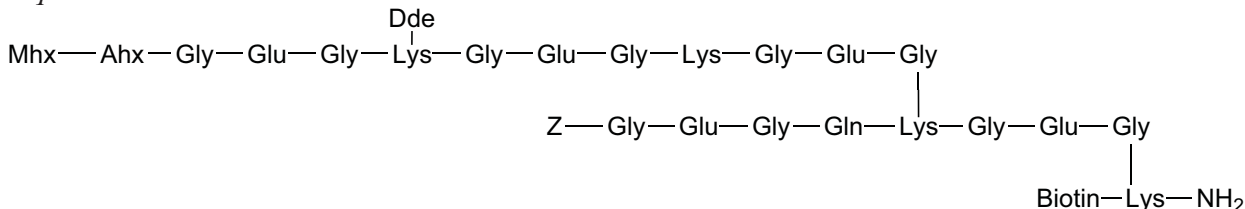
berechnet: 12 998.31 Da (13 006.45 Da Ø)

exprimierten ECL_{expr} 2

Synthese des linearen Templates

0.1 % TFA/20 % ACN/H₂O gelöst.^{[65][66]}

Sequenz



Ausbeute

9 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

$$t_p = 18.55 \text{ min (Reinheit 93 \%)}$$
LC-MS
$$t_R = 2.31 \text{ min,}$$

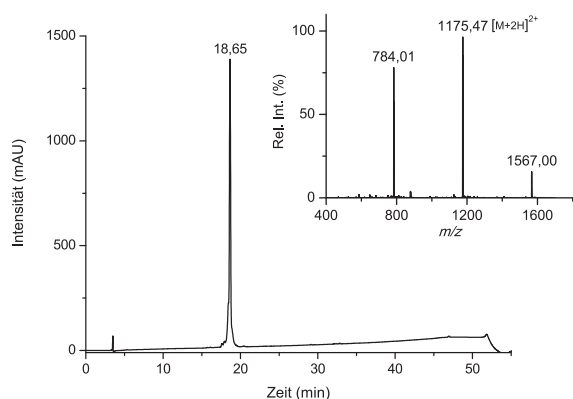
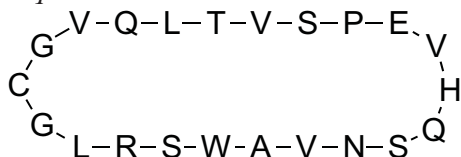
gefunden: 2 632.11 Da,

berechnet: 2 631.23 Da (2 632.86 Da Ø)

Synthese des extrazellulären Loop 1 (ECD2; ECL1, Loop 1)

Der Loop 1 wurde am Syro II auf 1 g TentaGel-S-Trt-Gly-Harz nach der Fmoc-Strategie mit Doppelkupplungen unter der Verwendung von Boc-Cys-OH, Fmoc-Val-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH und Fmoc-Trp(Boc)-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH durchgeführt.^[150] Die Abspaltung des vollgeschützten Peptides, Thioesterbildung für die Zyklisierung per NCL und Schutzgruppen-Abspaltung wurde analog zum Segment A durchgeführt. Für die Zyklisierung mittels NCL wurden jeweils 100 mg des Peptid-Thioesters und 50 mg TCEP•HCl (5 Äq.) in 0.1 % 1 M NaHCO_3 /50 % ACN/ H_2O für 1 h bei RT gerührt und die gesamte Lösung anschließend lyophilisiert. Zur Reinigung per RP-HPLC (System 4) wurde der Loop 1 in 0.1 % TFA/50 % ACN/ H_2O gelöst.

Sequenz



Ausbeute

20 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

$t_R = 18.65$ min (Reinheit 97 %)

LC-MS

$t_R = 2.26$ min,

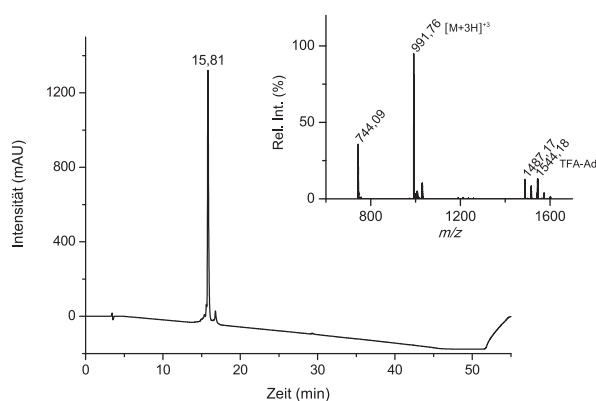
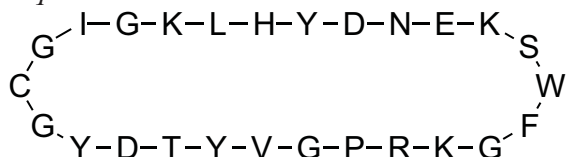
gefunden: 2 348.97 Da,

berechnet: 2 348.17 Da (2 349.62 Da Ø)

Synthese des extrazellulären Loop 2 (ECD3; ECL2, Loop 2)

Für die Kupplung der ersten AS für den Loop 2 wurden 1.5 g TentaGel-S-Trt-Harz mit 10 ml 19 % Acetylchlorid in DCM über 4 h bei RT unter Rühren ins Chlorid überführt. Die Kupplung von 297 mg Fmoc-Gly-OH (1 mmol, 3 Äq.) mit 171 µl DIPEA (1 mmol, 3 Äq.) in 10 ml DCM fand über Nacht bei RT unter Schütteln statt.^[152] Die Pseudoproline Fmoc-Lys(Trt)-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH und Fmoc-Tyr(*t*Bu)-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH und für das N-terminale Cystein Boc-Cys-OH wurden für die SPPS am Automaten 433a genutzt. Sowohl die automatisierte SPPS, die Harzabspaltung, Thioesterbildung und die Schutzgruppen-Abspaltungen, als auch die NCL-Zyklisierung fanden analog zum Loop 1 statt. Der Loop 2 wurde präparativ auf System 4 gereinigt.

Sequenz



Ausbeute

6 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

t_R = 15.81 min (Reinheit 93 %)

LC-MS

t_R = 2.37 min,

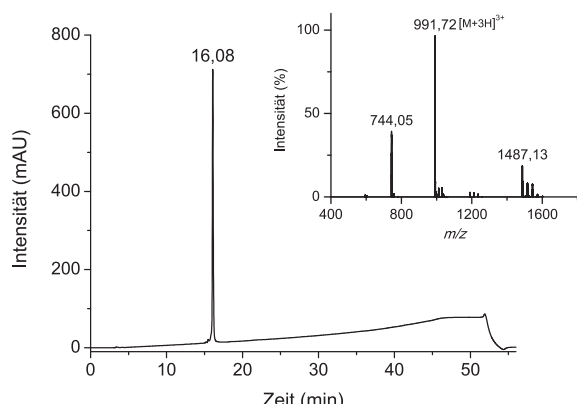
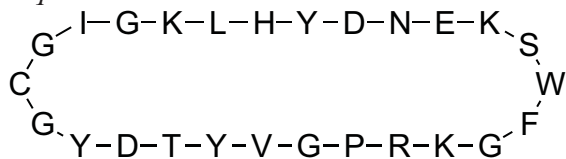
gefunden: 2 972.30 Da,

berechnet: 2 971.41 Da (2 973.28 Da Ø)

Biosynthese des extrazellulären Loop 2 ($ECD_{expr}3$; $ECL_{expr}2$, $Loop_{expr}2$)

Für die Expression des $Loop_{expr}2$ wurde die DNA CRF1-ECD3 in einen pTWIN2-Vektor^[138] eingebaut. Hierbei wurde als N-terminales Intein *Ssp Dna B* und als C-terminales Intein *Mth RIR1* verwendet. Zur Kolonienzucht wurde das Plasmid in chemikompetenten *E. coli* Origami-Zellen in S.O.C.-Medium (2 % W/V Trypton, 0.5 % W/V Hefeextrakt, 8.6 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM $MgSO_4$, 20 mM Glukose) für 1 h bei RT unter Schütteln transformiert. Damit wurden LB-Agar-Platten (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar) beimpft, welche Ampicillin (Endkonz. 100 µg/ml) enthielten. Jeweils eine Kolonie wurde für die Übernachtskultur gepickt und in drei Mal 10 ml LB-Medium mit Ampicillin (Endkonz. 100 µg/ml) über Nacht bei 30 °C inkubiert. Diese drei Mal 10 ml Übernachtskulturen wurden auf jeweils zwei Mal 500 ml LB-Medium mit Ampicillin (Endkonz. 100 µg/ml) aufgeteilt und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 0.5-0.7 inkubiert. Der Expressionsstart wurde durch die Zugabe von IPTG (Endkonz. 500 mM) ausgelöst und über Nacht bei 37 °C belassen. Zellernte fand durch Zentrifugation (15 min, 5 550 x g, 4 °C) statt. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im Lysis-Puffer (20 mM Tris•HCl, 150 mM NaCl, 0.05 % Triton X-100, pH 7.5) resuspendiert. Für den Aufschluss wurden die Zellen extensiv im Aufschluss-Puffer (20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.0) an einem Hochdruckhomogenisator (EmulsiFlex C3 von AVESTIN Inc.) behandelt und anschließend zentrifugiert (1 x 30 min & 2 x 15 min, 4 200 x g, 4 °C). Die Abspaltung des N-terminalen Inteins *Ssp Dna B* wurde bewirkt, indem die Inclusionbodies im Abspaltungs-Puffer (6 M Gn•HCl, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 5 mM TCEP•HCl, pH 6.5, Incl.-bod. Konz. 150 mg/ml) über Nacht bei RT schwach geschüttelt wurden. Nach Abzentrifugieren (20 min, 4 000 x g) des unlöslichen Teils wurde simultan die Abspaltung des C-terminalen Inteins *Mth RIR1*, die Thioesterbildung mittels MESNA und EPL-vermittelte Zyklisierung, sowie die Rückfaltung im Faltung-Puffer (20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 500 mM Arginin, 1 mM EDTA, 100 mM MESNA, Verdünnung 1:50) über Nacht bei 8 °C unter moderatem Rühren durchgeführt.^[138] Die komplette Lösung wurde ohne weitere Behandlung zur Reinigung auf die RP-HPLC-Säule (System 2) aufgetragen.

Sequenz



Ausbeute

5.33 mg, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

$t_R = 16.08$ min (Reinheit >99 %)

LC-MS

$t_R = 2.50$ min,

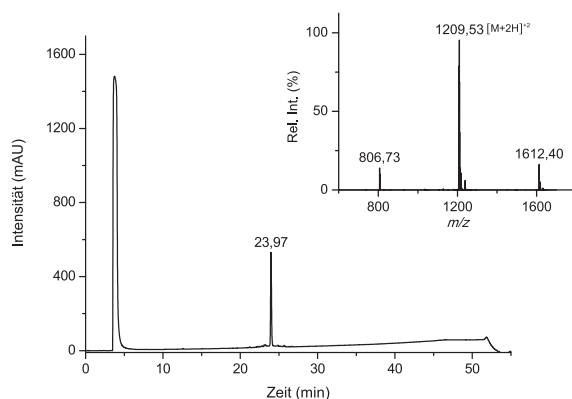
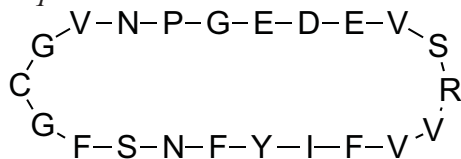
gefunden: 2 972.18 Da,

berechnet: 2 971.41 Da (2 973.28 Da Ø)

Synthese des extrazellulären Loop 3 (ECD4; ECL3, Loop 3)

Die Synthese des Loop 3 wurde entsprechend der des Loop 1 am P-11 auf 1 g TentaGel-S-Trt-Gly-Harz durchgeführt, einschließlich der Harzabspaltung, Thioesterbildung, Schutzgruppen-Abspaltung und Zyklisierung per NCL. Abweichend ist die Aufarbeitung nach dem Stoppen der NCL mittels TFA. Hier wurde die Lösung anschließend zentrifugiert (5 min, 4 000 x g) und der Überstand eingengt, wobei der Loop 3 ausfällt. Dieser wurde zentrifugiert (5 min, 4 000 x g), der Überstand verworfen und der Niederschlag (NS) lyophilisiert. Für die Reinigung per RP-HPLC (System 4) wurde der NS in DMSO aufgenommen.

Sequenz



Ausbeute

8 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

$t_R = 23.97$ min (Reinheit 97 %)

LC-MS

$t_R = 3.00$ min,

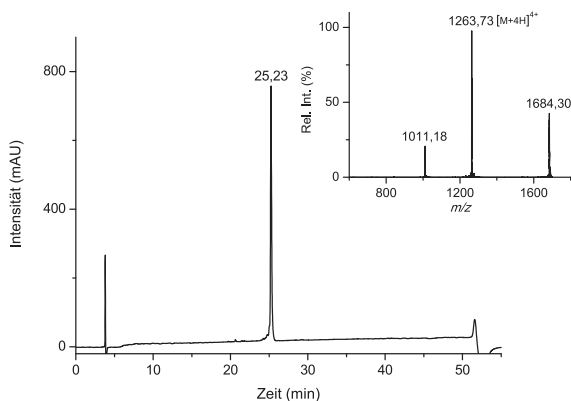
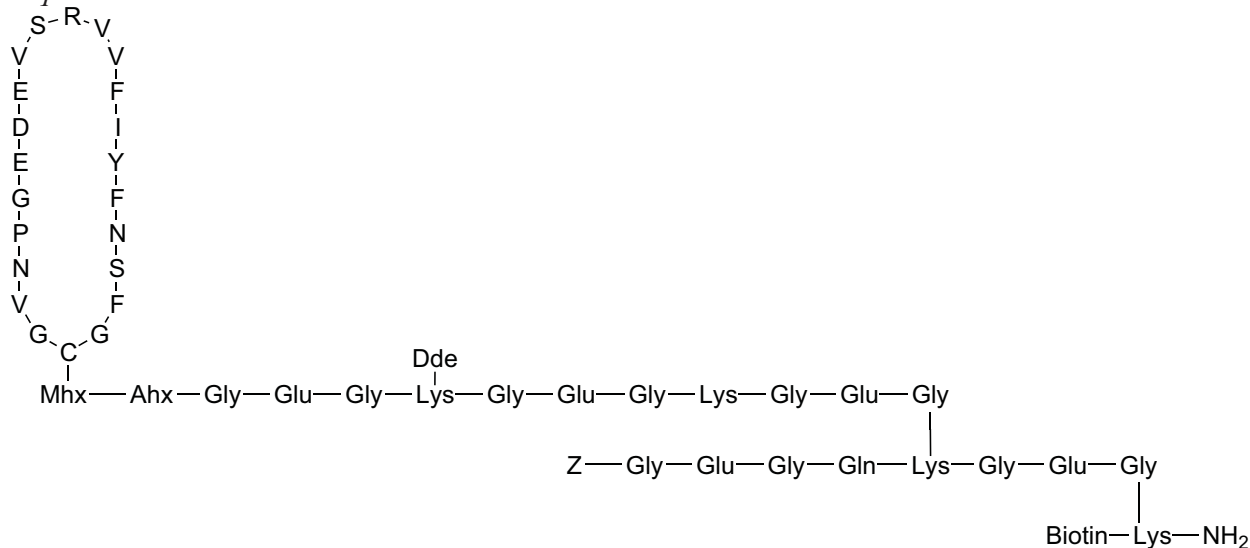
gefunden: 2 417.11 Da,

berechnet: 2 416.12 Da (2 417.65 Da Ø)

Synthese von Templat-ECL3

Die Kupplung von 176.5 mg ECL3 (0.07 mmol, 1.2 Äq.) an 159.4 mg lineares Templat (0.06 mmol) fand in 9 ml DMSO mit 200 µl 1 M NaHCO₃ bei pH 8.5 unter Rühren über einen Zeitraum von 1 h statt. Dabei wurde die Lösung leicht trüb. Analyse per LC-MS ergab nach Filtration, dass sowohl im Feststoff, als auch im Überstand das Produkt enthalten ist. Somit wurde nach Lyophilisieren beides zusammen präparativ gereinigt (System 5).^{[65][66]}

Sequenz



Ausbeute

25 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System C)

$t_R = 25.23$ min (Reinheit 93 %)

LC-MS

$t_R = 3.09$ min,

gefunden: 5 050.54 Da,

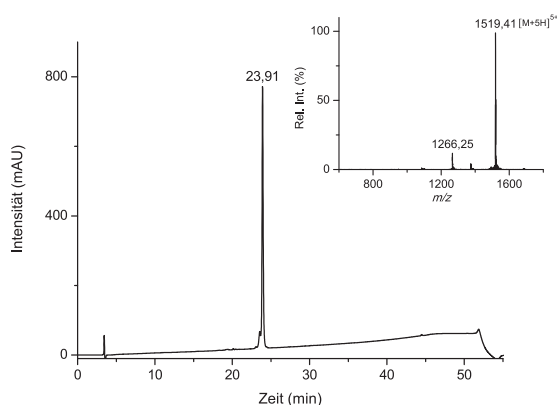
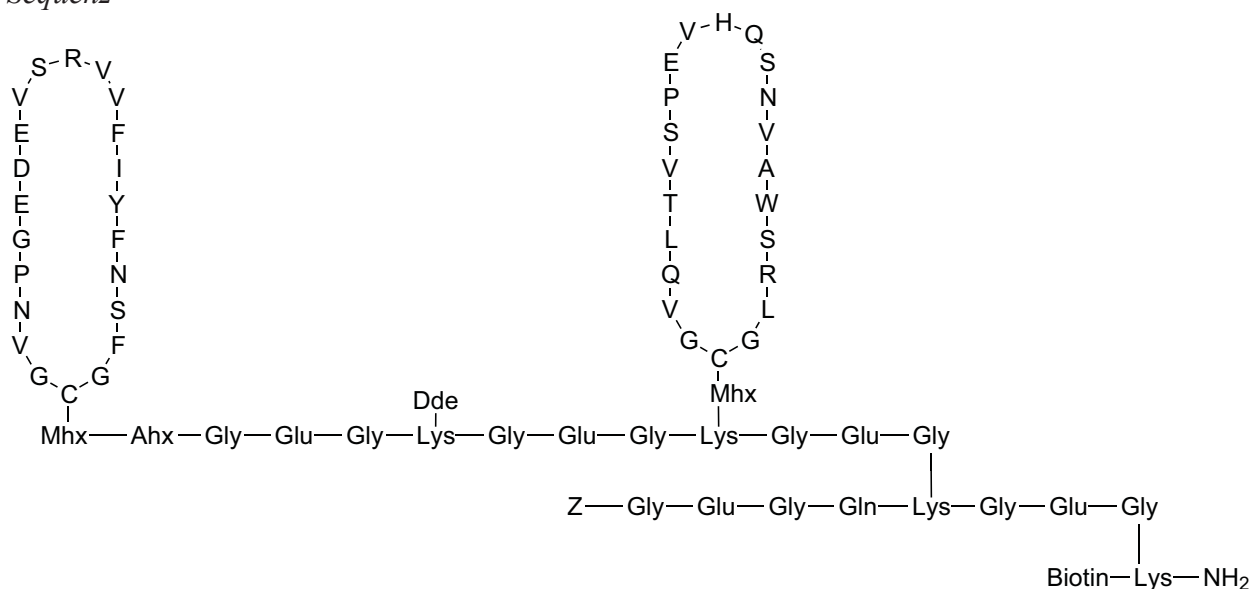
berechnet: 5 047.33 Da (5 050.50 Da Ø)

Synthese von Templat-ECL1-ECL3

Zur Bildung des Maleimidohexansäure-Esters, an welchen der Loop 1 gekuppelt werden sollte, wurden 60 mg Templat-ECL3 (12.6 μmol) und 25 mg Mhx-OSu (100 μmol , 8 Äq.) in 3.52 ml DMSO/H₂O/1 M NaHCO₃ (150/25/1, pH 8.5) gelöst und für 1 h unter Rühren bei RT belassen. Es wurde direkt im Anschluss per RP-HPLC (System 4) aufgereinigt.^{[65][66]}

Die Thiol-Maleimid-Reaktion zur Kupplung von 47 mg ECL1 (20 μmol , 1.5 Äq.) an 67 mg Templat-ECL3-Maleimidohexansäure-Ester (13.6 μmol) wurde in 3.51 ml DMSO/H₂O/1 M NaHCO₃ (300/50/1, pH 8.5) über 90 min bei RT durchgeführt, um im Anschluss aufgereinigt zu werden (System 3).^{[65][66]}

Sequenz



Ausbeute

26 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

t_R = 23.91 min (Reinheit 93 %)

LC-MS

t_R = 3.15 min,

gefunden: 7 591.73 Da,

berechnet: 7 588.58 Da (7 593.33 Da Ø)

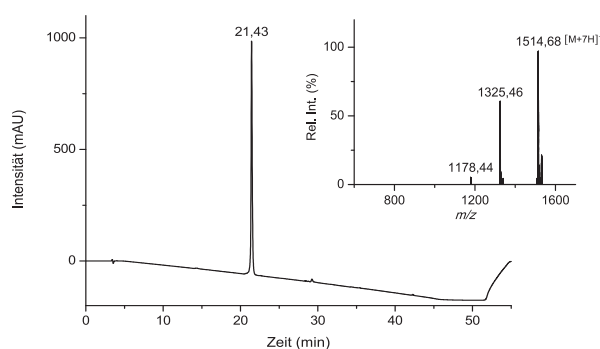
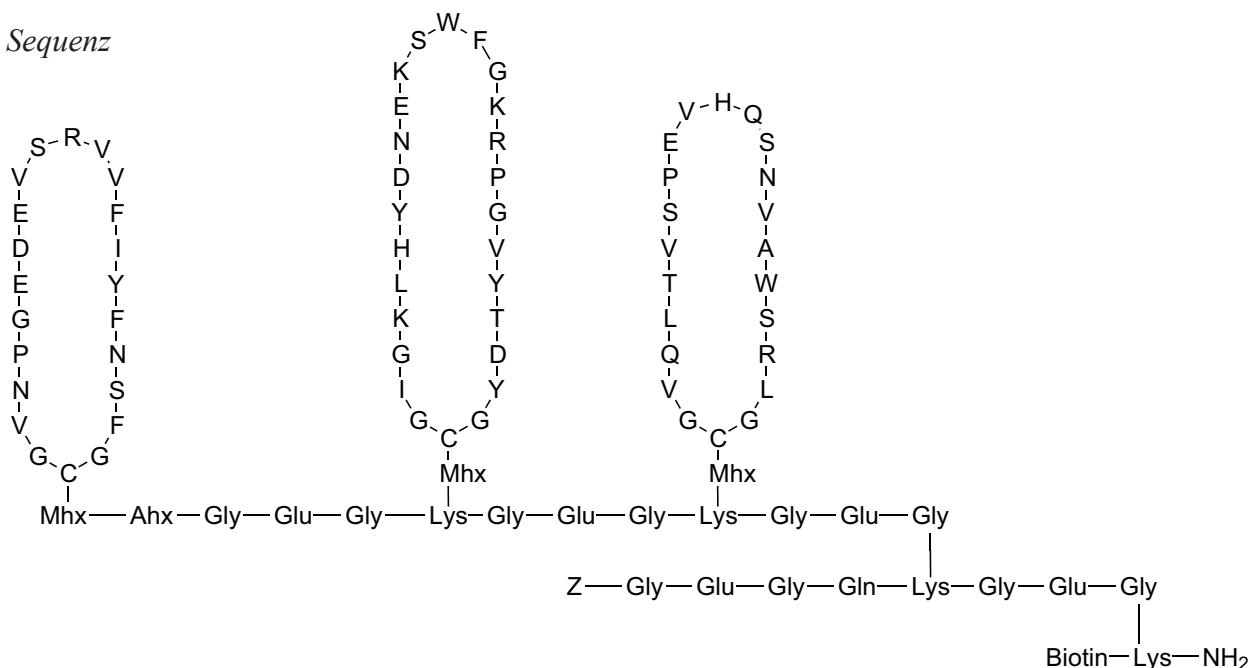
Synthese von Templat-ECL1-ECL_{expr}2-ECL3

Für diese Synthese wurden 134 mg Templat-ECL1-ECL3 (18.4 µmol) in 100 ml H₂O suspendiert (pH 3.8) und anschließend der pH-Wert mit 2.5 %-iger NH₃-Lösung auf 6.3 eingestellt, was zu einer klaren Lösung führte. Diese Lösung wurde dann lyophilisiert. Der gesamte Ansatz wurde für die Dde-Schutzgruppen-Abspaltung in 7840 µl DMF (leichte Trübung) gelöst, um dann für zehn Minuten nach der Zugabe von 160 µl Hydrazin (trübe Lösung) bei RT gerührt zu werden. Abstoppen erfolgte mit 400 µl TFA und für die präparative RP-HPLC wurden 1000 µl H₂O dazu gegeben, was zu einer klaren Lösung führte.^{[65][66]}

Die Bildung des Maleimidohexansäure-Esters erfolgte, wie oben beschrieben, in DMSO/1 M NaHCO₃ bei einem pH-Wert von 8.3. Abweichend wurden hier nach 1 h nochmals Mhx-OSu (zusätzl. 1.5 Äq.) und 10 µl der 1 M NaHCO₃-Lösung zugegeben und weitere 30 min bei RT gerührt. Die gesamte Menge wurde auf die Säule zur Reinigung (System 3) aufgetragen.

Die Kupplung des Loop_{expr}2 erfolgte genau wie die des Loop 1 und wurde ebenfalls über eine RP-HPLC (System 3) aufgereinigt.

Sequenz



Ausbeute

44 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

t_R = 21.43 min (Reinheit 99 %)

LC-MS

t_R = 2.90 min,

gefunden: 10 596.07 Da,

berechnet: 10 588.99 Da (10 595.60 Da Ø)

Synthese des linearen Konstruktes

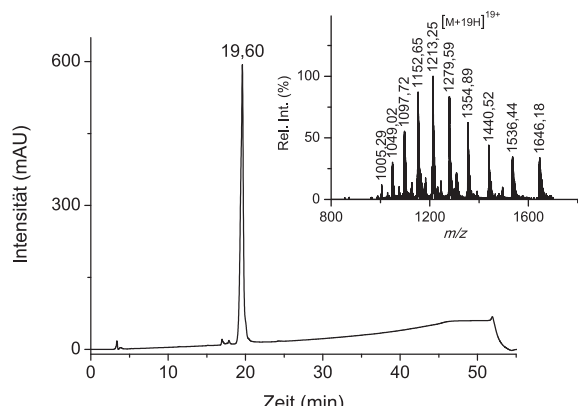
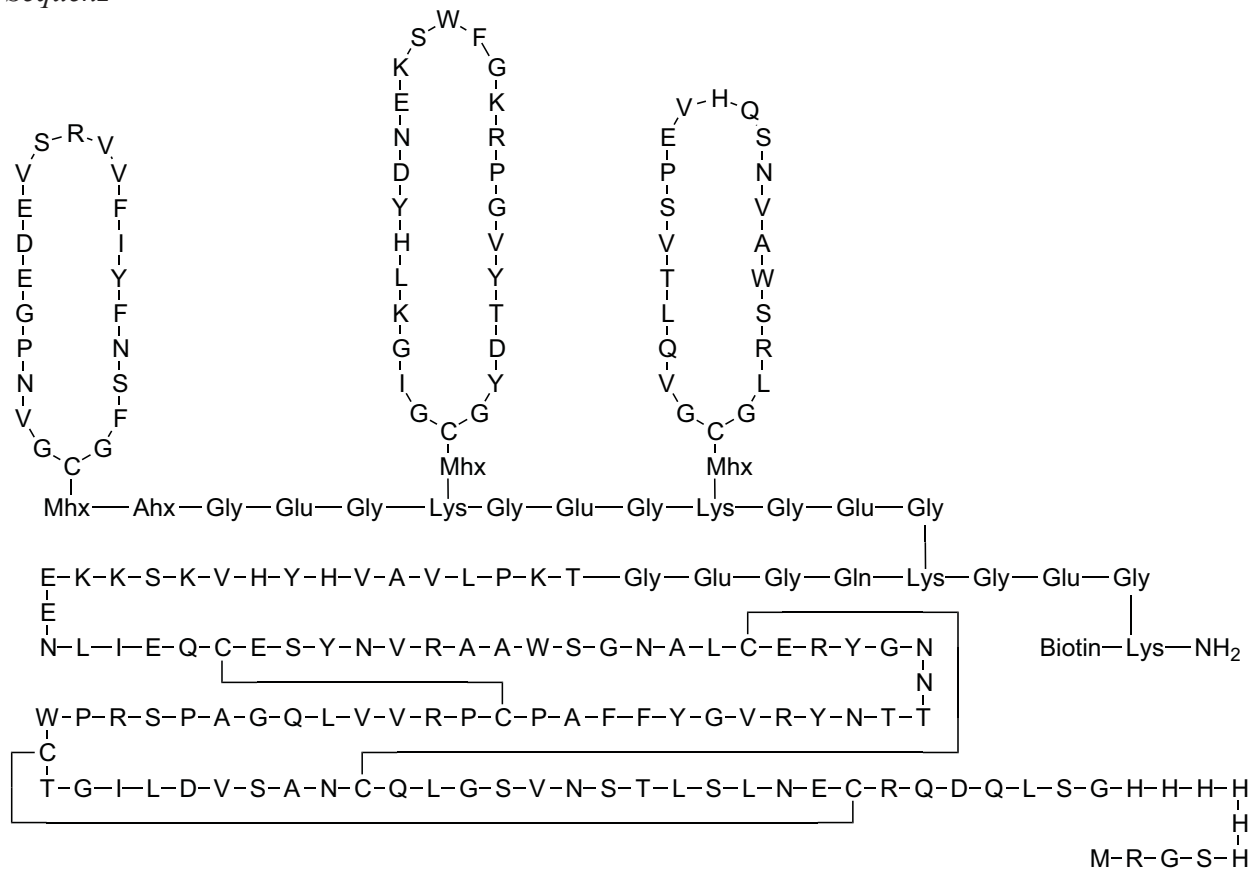
Der letzte Schritt zum linearen Konstrukt beinhaltet die Sortase A-vermittelte Ligation des N-Terminus an das Templat-ECL1-ECL2-ECL3. Die hierfür benötigte Sortase A wurde folgendermaßen biosynthetisch gewonnen:

Die Sortase A (SrtA wild type (WT) $\Delta 59$ aus *Staphylococcus aureus*) wurde aus dem Konstrukt pET21a-SrtA(WT) in *E. coli* BL21 (λ DE3) exprimiert. Hierfür wurden frisch transformierte *E. coli* zur Beimpfung von einem Liter Kultur (2 x LB-Medium mit Ampicillin 100 μ g/ml) genutzt. Die Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 0.5-0.7 wachsen gelassen. Dann wurde sie auf 18 °C abgekühlt und zum Expressionsstart IPTG und Ampicillin (Endkonz. 20 μ M & 0.3 mg/ml) zugegeben. Diese Kultur wurde bei 18 °C für 18-20 h geschüttelt. Anschließend wurde zentrifugiert (5-10 min, 20 000 x g, 4 °C), das Zellpellet in 15 ml immobilisierten Metal-Ion-Affinitäts-Chromatografie (IMAC)-Puffer (0.3 KCl, 0.05 M KH_2PO_4 , 5 mM Imidazol, 0.01 % W/V NaN_3 , pH 8.0) resuspendiert und bei -20 °C eingefroren und gelagert. Per Affinitätschromatografie erfolgte die Reinigung, wofür das eingefrorene Pellet im IMAC-Puffer resuspendiert wurde. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgespalten und zentrifugiert (15 min, 48 000 x g, 4 °C). Das Zellextrakt wurde auf eine vorgepackte His-trap Nickel-Säule (5 ml) aufgetragen und anschließend die Säule mit 50 ml IMAC-Puffer gewaschen. Daraufhin wurde die Säule mit 25 ml Wasch-Lösung (0.3 M KCl, 0.05 M KH_2PO_4 , 10 mM Imidazol, 0.01 % NaN_3 ; pH 8.0) gespült. Das Protein wurde dann mit einem zweiten IMAC-Puffer (0.3 M KCl, 0.05 M KH_2PO_4 , 250 mM Imidazol, 0.01 % NaN_3 , pH 8.0) eluiert und das Eluat mittels Ultrafiltration (MWCO 10 000 Da) auf 5 ml eingengt. Die darauf folgende Gelfiltration fand auf einer Superdex 75 16/600 nm Säule mit PBS Puffer (140.0 mM NaCl, 10.0 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.7 mM KCl, 1.8 M KH_2PO_4 , pH 7.3) bei pH 8.0 in Anwesenheit von 0.01 % NaN_3 statt. Daraufhin wurde die gelfiltrierte Probe abermals mit Hilfe von Ultrazentrifugation (MWCO 10 000 Da) auf eine Endkonzentration von 19 mM aufkonzentriert.

Die Z-Schutzgruppe, welche die Sortase A-Bindungsstelle schützt, wurde zunächst von 5 mg Templat-ECL1-ECL2-ECL3 (0.7 μ mol) mit 2 ml 5 % H_2O /TFA über zwei Tage lang bei RT abgespalten. Zu dieser Lösung wurden 8 ml H_2O zugegeben (weißer NS) und weitere 3.5 h bei RT gerührt, bevor die gesamte Lösung lyophilisiert wurde. Das entschützte Produkt wurde ohne weitere Behandlung direkt zur Sortase A-vermittelten Ligation weiter verwendet. Dafür wurden 7 mg N-Terminus (0.8 μ mol, 1.2 Äq.) mit dem Templat-ECL1-ECL2-ECL3 in 200 μ l DMSO gelöst, 600 μ l Sortase-Puffer (50 mM Tris•HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , pH 7.4) dazu gegeben und der pH-Wert mit NaOH und HCl auf 6 eingestellt. Anschließend wurden 63 μ l Sortase A (19 mM, 2.5 Äq.) dazu gegeben (milchige Lösung) und das Ganze bei RT stehen gelassen. Nach 90 min wurde auf Rühren umgestellt, um nach weiteren 90 min das Rühren wieder einzustellen und 200 μ l DMSO zuzugeben. Nach nochmals 90 min wurde mit 9 M

Harnstoff-Puffer der pH-Wert auf 7 gestellt. Nach insgesamt 5 h wurde die Ligation durch Zugabe von 600 µl 0.1 M HCl abgestoppt und im direkten Anschluss RP-chromatografisch gereinigt (System 3).

Sequenz



Ausbeute

42 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

t_R = 19.60 min (Reinheit 98 %)

LC-MS (mit 0.1 % FA)

t_R = 2.40 min,

gefunden: 23 027.87 Da,

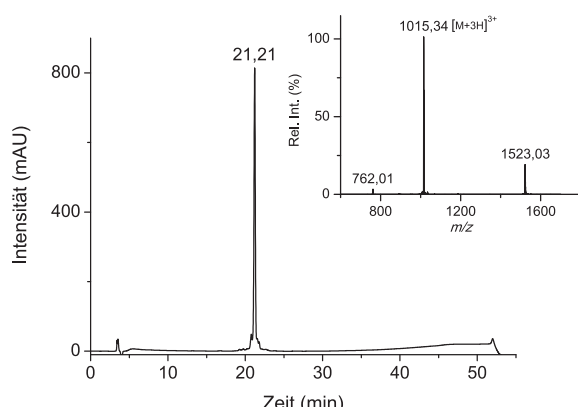
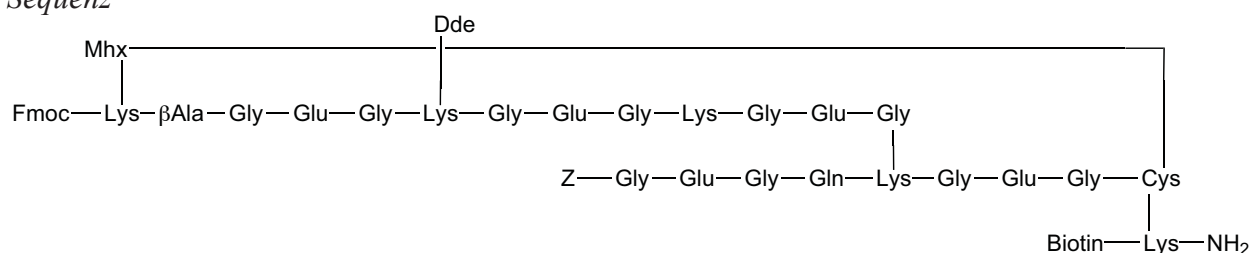
berechnet: 23 009.01 Da (23 023.44 Da Ø)

6.2.3.3. Synthese des zyklischen CRF1-Konstruktes

Synthese des zyklischen Templates (cycloTemplat)

Die Synthese des Templates, welches anschließend zyklisiert werden sollte, fand zunächst gemäß der Synthese des linearen Templates statt. Hierfür wurde auf 1 g TentaGel-S-RAM-Harz am P-11 bis zu den drei aufeinander folgenden Glycinen mit N-terminaler Z-Schutzgruppe synthetisiert^[148]. Die restliche Sequenz wurde durch manuelle Kupplungen aufgebaut^[150]. Die Lys-Seitenkette über welche die Zyklisierung stattfinden sollte wurde zunächst mit Mmt geschützt und die N-terminale Aminogruppe mit Fmoc. Vor der Kupplung von Mhx an das Lys nach obiger Vorschrift wurde die Mmt-Schutzgruppe mit 3 % TFA in DCM für 3 min gespalten. Die Abspaltung vom Harz und der restlichen Schutzgruppen erfolgte mit 20 ml 5 % H₂O/2 % TIPS/TFA. Für die Zyklisierung über die Maleimido-Thiol-Reaktion wurden jeweils 115 mg des unzyklisierten Templates (0.04 mmol) in 100 ml ACN/H₂O (1/1) über Nacht bei RT rühren gelassen und anschließend lyophilisiert. Für die präparative Reinigung (System 5) wurde das zyklische Templat in 0.1 % TFA/30 % ACN/H₂O aufgenommen.

Sequenz



Ausbeute

18 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

t_R = 21.21 min (Reinheit 99 %)

LC-MS

t_R = 2.76 min,

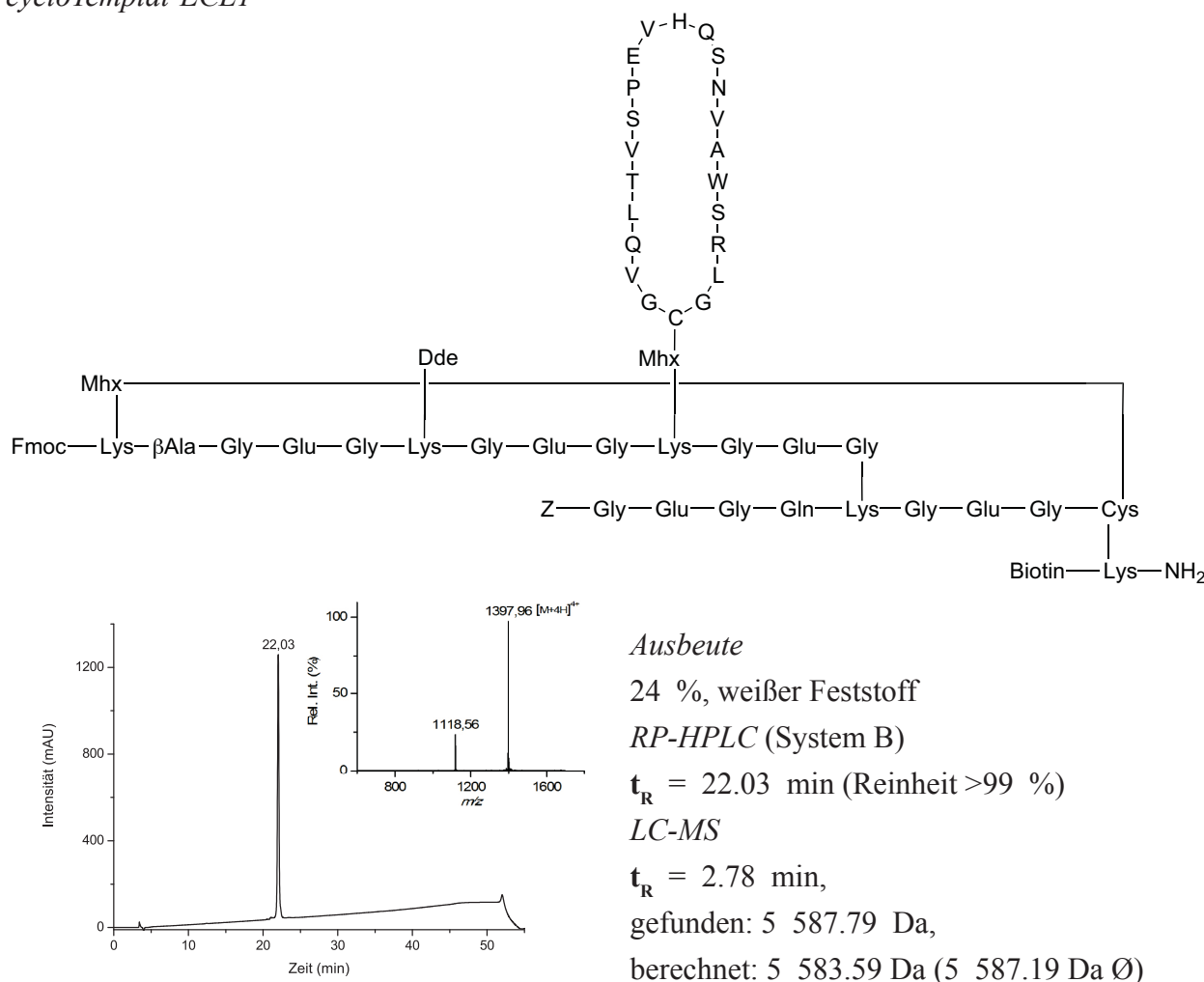
gefunden: 3 043.68 Da,

berechnet: 3 042.35 Da (3 044.36 Da Ø)

Synthese des zyklischen Konstruktes

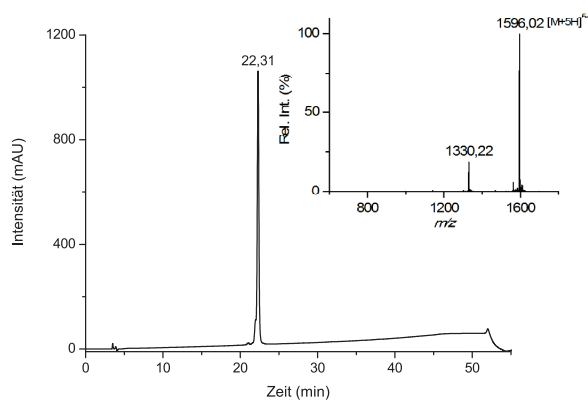
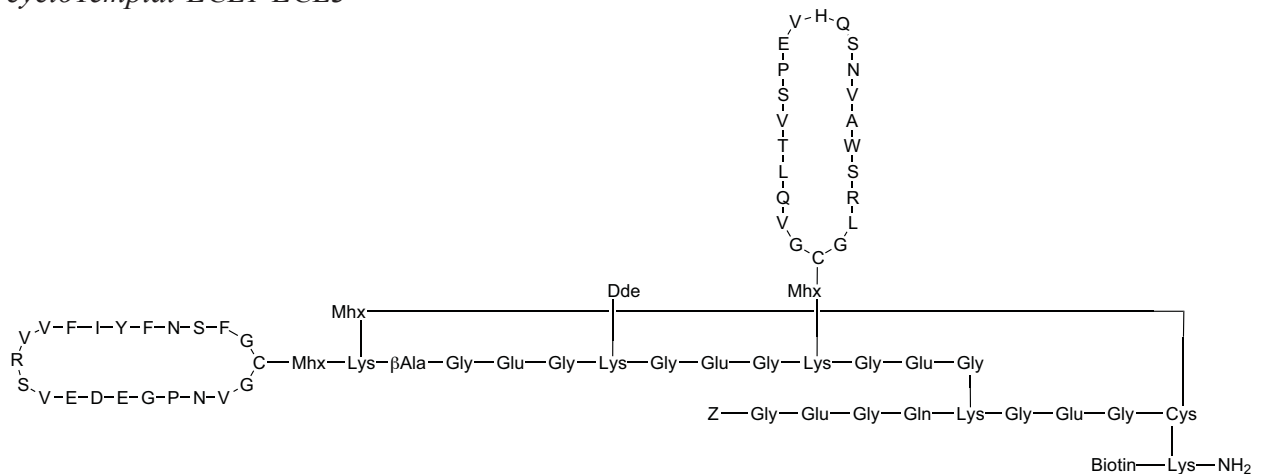
Bei der Synthese des zyklischen Konstruktes wurde zuerst der Loop 1 an das zyklische Templat gekuppelt. Hierfür wurde auch wieder ein Maleimidohexansäure-Ester gebildet. 30.1 mg Mhx (0.14 mmol, 4 Äq.) und 16.1 mg N-Hydroxysuccinimid (HOSu) (0.14 mmol, 4 Äq.) wurden mit 21.7 µl DIC (0.14 mmol, 4 Äq.) in 5 ml DCM für 30 min bei RT umgesetzt, anschließend das DCM verdampft und alles in 3 ml DMSO aufgenommen. Dazu wurden 110.7 mg cycloTemplat (80.04 µmol), 1 ml H₂O und 100 µl NaHCO₃ addiert. Die Reaktion wurde 1 h bei RT belassen und im direkten Anschluss säulenchromatografisch gereinigt (System 2). Die Kupplung des Loop 1 an das Maleimid erfolgte wie beim linearen Konstrukt.

cycloTemplat-ECL1



Als nächstes wurde zur Kupplung des Loop 3 die Fmoc-Schutzgruppe des N-Terminus vom β-Alanin manuell entfernt und gemäß der obigen Beschreibungen der Maleimidohexansäure-Ester gebildet um anschließend den Loop 3 per Ligation zukuppeln. Die Aufreinigung fand an System 4 statt.

cycloTemplat-ECL1-ECL3



Ausbeute

37 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

$t_R = 22.31$ min (Reinheit 91 %)

LC-MS

$t_R = 2.74$ min,

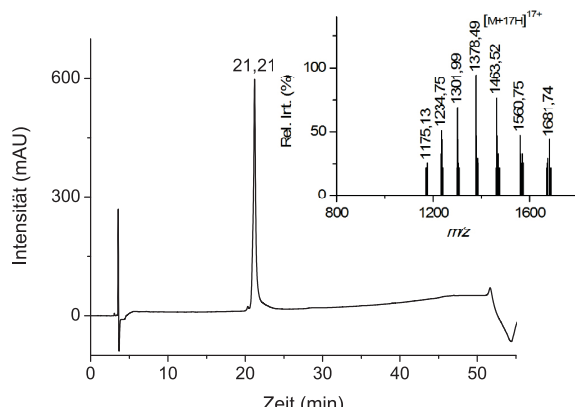
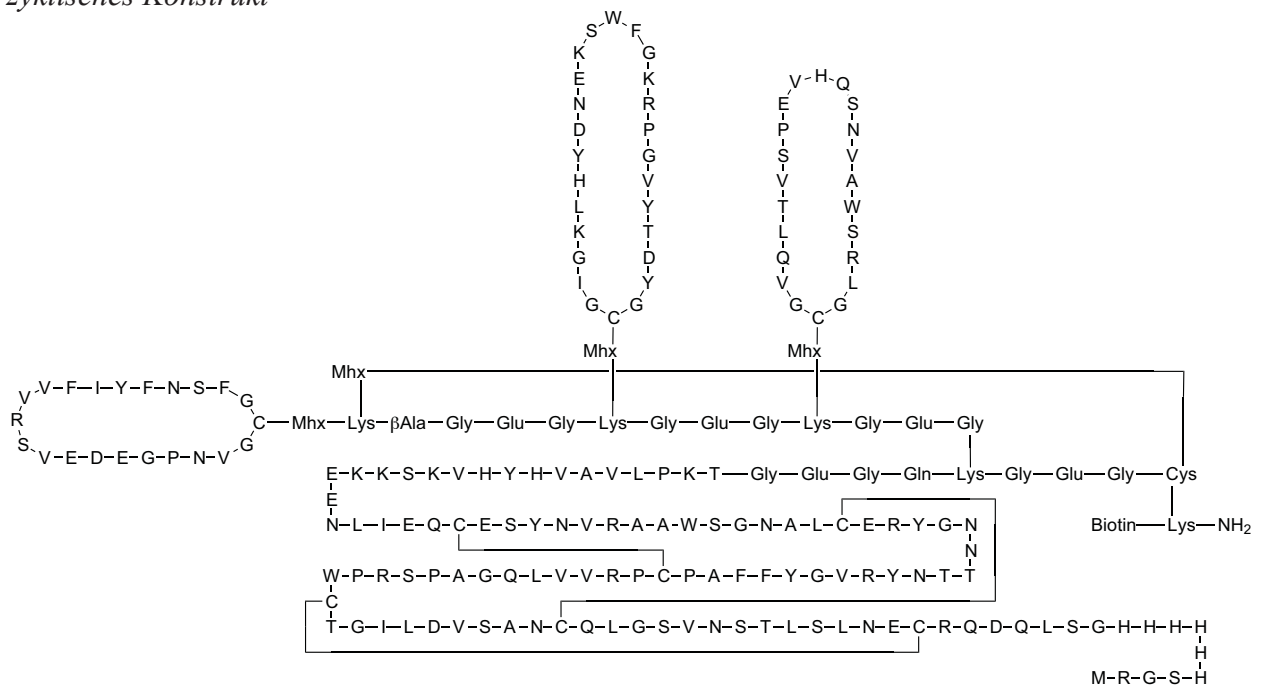
gefunden: 7 975.17 Da,

berechnet: 7 971.67 Da (7 976.81 Da Ø)

Von hier an ist die Synthese des zyklischen Konstruktes gleich der des linearen Konstruktes.

berechnet: 10 973.13 Da (10 980.09 Da Ø)

zyklisches Konstrukt



Ausbeute

36 %, weißer Feststoff

RP-HPLC (System B)

$t_R = 21.21$ min (Reinheit 99 %)

LC-MS

$t_R = 2.54$ min,

gefunden: 23 407.80 Da,

berechnet: 23 393.15 Da (23 407.92 Da Ø)

6.2.4. Biologische Untersuchungen der Mimetika

6.2.4.1. *GTP γ S-Assay*

Es wurde dreifach 3-10 μ g Membran-Protein mit 100 pM [35 S]GTP γ S in einem Gesamtvolumen von 500 μ l Medium (50 mM Tris•HCl, 100 mM NaCl, 0.1 μ M Guanosindiphosphat, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure, 1 mg/ml BSA, 0.15 mM Bacitracin; pH 7.4) bei 25 °C für 120 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Filtration durch einen Whatman GF/B Filter unter der Verwendung eines Brandel Harvesters (Gaithersburg, MD) abgestoppt. Anschließend wurde die 35 S-Aktivität im Filter bestimmt.

Dosis-Wirkungs-Kurven der Stimulation der [35 S]GTP γ S-Bindung durch die Aktivierung des membrangebundenen CRF-Rezeptors auf Grund von Sauvagin/Urocortin wurde durch nicht-lineare Regression unter der Verwendung des Programmes PRISM4 (GraphPad Software, San Diego) gefittet.

Für die Dissoziations-Experimente wurden die Membranen mit [35 S]GTP γ S mit oder ohne Sauvagin/Urocortin bei 25 °C für 90 min inkubiert. Nach dem Abkühlen im Eisbad wurde die Membran, um die Dissoziation zu verschiedenen Zeitpunkten bei 25 °C zu initiieren, zentrifugiert und in frischem Medium mit 1 μ M unmarkiertem GTP γ S bei 25 °C inkubiert. Es wurde kontrolliert, dass im Eisbad keine Dissoziation stattfindet.

6.2.4.2. *Bindungs-Assay*

Aus einer Stocklösung wurden Verdünnungsreihen für die Liganden (Sauvagin/Urocortin) angelegt. Das Tracer-Gemisch wurde hergestellt. Die Streptavidin-Sepharose-Lösung wurde gründlich durchmischt und zu 100 μ l wurden 2 ml RKA-Puffer 2 (100 mM Tris•HCl, 200 mM NaCl, 20 mM MgCl₂•6 H₂O, 0.2 % BSA; pH 7.4) gegeben, zentrifugiert (20 000 x g, 10 min, 4 °C), abdekantiert und zum Sediment wurden abermals 500 μ l RKA-Puffer 2 gegeben. Das Ganze wurde gut vermischt.

RKA-Puffer 1 (50 mM Tris•HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂•6 H₂O, 0.1 % BSA; pH 7.4) wurde vorgelegt, die entsprechende Ligand-Verdünnung zu pipettiert und alles zum Tracer-Gemisch gegeben. Zu der Lösung wurde aus einer Stocklösung des jeweiligen Rezeptor-Konstruktes die entsprechende Konzentration pipettiert und bei 25 °C für 2 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 50 μ l der Streptavidin-Bead-Lösung zu pipettiert und bei 25 °C über 30 min inkubiert. Anschließend wurde 1 ml RKA-Puffer 2 dazu gegeben, kurz

vermischt, zentrifugiert ($16\,000 \times g$, 10 min), abdekantiert und die restliche Flüssigkeit mittels Pipette abgenommen und anschließend die Radioaktivität der gebundenen Liganden im Pellet im Wizard 1470 vermessen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Einleitung

- [1] „The Nobel Prize in Chemistry 2012 - Press Release“. *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2013. Web. 17 Jul 2013. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2012/press.html>.
- [2] „The Nobel Prize in Chemistry 2012 - Popular Information“. *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2013. Web. 17 Jul 2013. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2012/popular.html>.
- [3] „The Nobel Prize in Chemistry 2012 - Advanced Information“. *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2013. Web. 17 Jul 2013. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2012/advanced.html>.
- [4] R. J. Lefkowitz, J. Roth, W. Pricer, I. Pastan; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **1970**; 65; 745-752.
- [5] R. J. Lefkowitz, J. Roth, I. Pastan; *Science*; **1970**; 170; 633-635.
- [6] R. A. F. Dixon, B. K. Kobilka, D. J. Strader, J. L. Benovic, H. G. Dohlman, T. Frielle, M. A. Bolanowski, C. D. Bennet, E. Rands, R. E. Diehl, R. A. Mumford, E. E. Slater, I. S. Sigal, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, C. D. Strader; *Nature*; **1986**; 321; 75-79.
- [7] S. G. F. Rasmussen, B. T. DeVree, Y. Zou, A. C. Kruse, K. Y. Chung, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. S. Chae, E. Pardon, D. Calinski, J. M. Mathiesen, S. T. A. Shah, J. A. Lyons, M. Caffrey, S. H. Gellman, J. Steyaert, G. Skiniotis, W. I. Weis, R. K. Sunahara, B. K. Kobilka; *Nature*; **2011**; <http://dx.doi.org/10.1038/nature10361>.
- [8] G. Casi, D. Hilvert; *Curr. Opin. Struct. Biol.*; **2003**; 13; 589-594.
- [9] D. Schwarzer, P. A. Cole; *Curr. Opin. Struct. Biol.*; **2005**; 9; 561-569.
- [10] U. Arnold; *Biotechnol. Lett.*; **2009**; 31; 1129-1139.

Stand der Forschung

- [11] M. Bergmann, L. Zervas; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*; **1932**; 65; 1192-1201.
- [12] L. A. Carpino, G. Y. Hau; *J. Am. Chem. Soc.*; **1970**; 92; 5748-5749.
- [13] T. Wieland, W. Kern, R. Sehring; *Justus Liebigs Ann. Chem.*; **1950**; 596; 117-121.
- [14] J. C. Sheehan, G. P. Hess; *J. Am. Chem. Soc.*; **1955**; 77; 1067-1068.
- [15] W. König, R. Geiger; *Chem. Ber.*; **1970**; 103; 788-798.
- [16] F. Albericio; *Curr. Opin. Struct. Biol.*; **2004**; 8; 211-221.
- [17] R. B. Merrielfield; *J. Am. Chem. Soc.*; **1963**; 85; 2149-2154.
- [18] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann; *Nature*; **2000**; 403; 223-226.
- [19] C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer; *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2008**; 47; 10030-10074.
- [20] J. P. Tam, Z. Miao; *J. Am. Chem. Soc.*; **1999**; 121; 9013-9022.
- [21] J. P. Tam, J. Xu, K. D. Eom; *Biopolymers*; **2001**; 60; 194-205.
- [22] R. Huisgen, G. Szeimies, L. Möbius; *Chem. Ber.*; **1967**; 100; 2494-2507.

- [23] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless; *Angew. Chem.*; **2001**; *113*; 2056-2075.
- [24] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless; *Angew. Chem.*; **2002**; *114*; 2708-2711.
- [25] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau; *Justus Liebigs Ann. Chem.*; **1953**; 583; 129-149.
- [26] D. S. Kemp; *Biopolymers*; **1981**; *20*; 1793-1804.
- [27] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent; *Science*; **1994**; *266*; 776-779.
- [28] J. P. Tam, Y.-A. Lu, C.-F. Liu, J. Shao; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **1995**; *92*; 12485-12489.
- [29] P. E. Dawson, S. B. H. Kent; *Annu. Rev. Biochem.*; **2000**; *69*; 923-960.
- [30] T. M. Hackeng, J. H. Griffin, P. E. Dawson; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **1999**; *96*; 10068-10073.
- [31] S. B. H. Kent; *Chem. Soc. Rev.*; **2009**; *38*; 338-351.
- [32] X. Li, T. Kawakami, S. Aimoto; *Tetrahedron Lett.*; **1998**; *39*; 8669-8672.
- [33] G. W. Kenner, J. R. McDermott, R. C. Sheppard; *Chem. Commun.*; **1971**; 636-637.
- [34] B. J. Backes, J. A. Ellman; *J. Org. Chem.*; **1999**; *64*; 2322-2330.
- [35] R. Ingenito, E. Bianchi, D. Fattori, A. Pessi; *J. Am. Chem. Soc.*; **1999**; *121*; 11369-11374.
- [36] Y. Shin, K. A. Winans, B. J. Backes, S. B. H. Kent, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi; *J. Am. Chem. Soc.*; **1999**; *121*; 11684-11689.
- [37] D. Swinnen, D. Hilvert; *Org. Lett.*; **2000**; *2*; 2439-2442.
- [38] A. Sewing, D. Hilvert; *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2001**; *40*; 3395-3396.
- [39] T. Kawakami, M. Sumida, K. Nakamura, T. Vorherr, S. Aimoto; *Tetrahedron Lett.*; **2005**; *46*; 8805-8807.
- [40] N. Ollivier, J.-B. Behr, O. El-Mahdi, A. Blanpain, O. Melnyk; *Org. Lett.*; **2005**; *7*; 2647-2650.
- [41] K. Nakamura, H. Mori, T. Kawakami, H. Hojo, Y. Nakahara, S. Aimoto; *Int. J. Pept. Res. Ther.*; **2007**; *13*; 191-202.
- [42] F. Mende, O. Seitz; *Angew. Chem.*; **2007**; *119*; 4661-4665.
- [43] F. Mende, M. Beisswenger, O. Seitz; *J. Am. Chem. Soc.*; **2010**; *132*; 11110-11118.
- [44] R. von Eggelkraut-Gottanka, A. Klose, A. G. Beck-Sickinger, M. Beyermann; *Tetrahedron Lett.*; **2003**; *44*; 3551-3554.
- [45] S. Futaki, K. Sogawa, J. Maruyama, T. Asahara, M. Niwa; *Tetrahedron Lett.*; **1997**; *38*; 6237-6240.
- [46] L. E. Canne, P. Botti, R. J. Simon, Y. Chen, E. A. Dennis, S. B. H. Kent; *J. Am. Chem. Soc.*; **1999**; *121*; 8720-8727.
- [47] A. Brik, E. Keinan, P. E. Dawson; *J. Org. Chem.*; **2000**; *65*; 3829-3835.
- [48] T. Haack, M. Mutter; *Tetrahedron Lett.*; **1992**; *33*; 1589-1592.
- [49] D. Bang, S. B. H. Kent; *Angew. Chem.*; **2004**; *116*; 2588-2592.
- [50] V. Y. Torbeev, S. B. H. Kent; *Angew. Chem.*; **2007**; *119*; 1697-1700.
- [51] D. Bang, B. L. Pentelute, S. B. H. Kent; *Angew. Chem.*; **2006**; *118*; 4089-4092.

- [52] H. Mao, S. A. Hart, A. Schink, B. A. Pollok; *J. Am. Chem. Soc.*; **2004**; 126; 2670-2671.
- [53] S. Pritz, Y. Wolf, O. Kraetke, J. Klose, M. Bienert, M. Beyermann; *J. Org. Chem.*; **2007**; 72; 3909-3912.
- [54] H. Ton-That, G. Liu, S. K. Mazmanian, K. F. Faull, O. Schneewind; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **1999**; 96; 12424-12429.
- [55] L. A. Marraffini, A. C. DeDent, O. Schneewind; *Microbiol. Mol. Bio. Rev.*; **2006**; 70; 192-221.
- [56] R. G. Kruger, B. Otvos, B. A. Frankel, M. Bentley, P. Dostal, D. G. McCafferty; *Biochemistry*; **2004**; 43; 1541-1551.
- [57] I. Schechter, A. Berger; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **1967**; 27; 157-162.
- [58] K. Piotukh, B. Geltinger, N. Heinrich, F. Gerth, M. Beyermann, C. Freund, D. Schwarzer; *J. Am. Chem. Soc.*; **2011**; 133; 17536-17539.
- [59] B. L. Nilsson, M. B. Soellner, R. T. Raines; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*; **2005**; 34; 91-118.
- [60] M.-Q. Xu, F. B. Perler; *EMBO J.*; **1996**; 15; 5146-5153.
- [61] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **1998**; 95; 6705-6710.
- [62] M.-Q. Xu, T. C. Evans Jr.; *Methods*; **2001**; 24; 257-277.
- [63] B. Briand; *Dissertation*; Humboldt-Universität zu Berlin; **2009**.
- [64] S. Abel; *Diplomarbeit*; Humboldt-Universität zu Berlin; **2009**.
- [65] S. Pritz, O. Kraetke, A. Klose, J. Klose, S. Rothmund, K. Fechner, M. Bienert, M. Beyermann; *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2008**; 47; 3642-3645.
- [66] S. Pritz; *Dissertation*; Humboldt-Universität zu Berlin; **2008**.
- [67] C. H. Trinh, D. P. Smith, A. P. Kalverda, S. E. V. Phillips, S. E. Radford; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **2002**; 99; 9771-9776.
- [68] P. J. Bjorkman, M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger, D. C. Wiley; *Nature*; **1987**; 329; 506-512.
- [69] S. Yamamoto, J. J. Kazama, I. Narita, H. Naiki, F. Gejyo; *Bone*; **2009**; 45; S39-S42.
- [70] H. E. White, J. L. Hodgkinson, T. R. Jahn, S. Cohen-Krausz, W. S. Gosal, S. Müller, E. V. Orlova, S. E. Radford, H. R. Saibil; *J. Mol. Biol.*; **2009**; 389; 48-57.
- [71] F. Gejyo, T. Yamada, S. Odani, Y. Nakagawa, M. Arakawa, T. Kunitomo, H. Kataoka, M. Suzuki, Y. Hirasawa, T. Shirahama, A. S. Cohen, K. Schmid; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **1985**; 129; 701-706.
- [72] D. V. Blaho, A. D. Miranker; *Biochemistry*; **2009**; 48; 6610-6617.
- [73] V. J. McParland, N. M. Kad, A. P. Kalverda, A. Brown, P. Kirwin-Jones, M. G. Hunter, M. Sunde, S. E. Radford; *Biochemistry*; **2000**; 39; 8735-8746.
- [74] C. J. Morgan, M. Gelfand, C. Atreya, A. D. Miranker; *J. Mol. Biol.*; **2001**; 309; 339-345.
- [75] S. L. Myers, S. Jones, T. R. Jahn, I. J. Morten, G. A. Tennent, E. W. Hewitt, S. E. Radford; *Biochemistry*; **2006**; 45; 2311-2321.
- [76] H. Fabian, C. Schultz, J. Backmann, U. Hahn, W. Saenger, H. H. Mantsch, D. Naumann; *Biochemistry*; **1994**; 33; 10725-10730.

- [77] S. Tremmel, M. Beyermann, H. Oschkinat, M. Bienert, D. Naumann, H. Fabian; *Angew. Chem.*; **2005**; *117*; 4707-4711.
- [78] H. Fabian, K. Gast, M. Laue, R. Misselwitz, B. Uchanska-Ziegler, A. Ziegler, D. Naumann; *Biochemistry*; **2008**; *47*; 6895-6906.
- [79] J. C. Spetzler, T. Hoeg-Jensen; *Bioorg. Med. Chem.*; **2007**; *15*; 4700-4704.
- [80] G. Casi, D. Hilvert; *J. Biol. Chem.*; **2007**; *282*; 30518-30522.
- [81] R. Röder, K. Bruns, A. Sharma, A. Eissmann, F. Hahn, N. Studtucker, T. Fossen, V. Wray, P. Henklein, U. Schubert; *J. Pept. Sci.*; **2008**; *14*; 954-962.
- [82] G. Casi, G. Roelfes, D. Hilvert; *ChemBioChem*; **2008**; *9*; 1623-1631.
- [83] B. Briand, N. Kotzur, V. Hagen, M. Beyermann; *Tetrahedron Lett.*; **2008**; *49*; 85-87.
- [84] Z. Fidan, A. Younis, P. Schmieder, R. Volkmer; *J. Pept. Sci.*; **2011**; *17*; 644-649.
- [85] A. Mosco, V. Zlatev, C. Guarnaccia, S. Pongor, A. Campanella, S. Zahariev, P. G. Giulianini; *PLoS ONE*; **2012**; *7*; e30052.
- [86] T. Wöhr, M. Mutter; *Tetrahedron Lett.*; **1995**; *36*; 3847-3848.
- [87] T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter; *J. Am. Chem. Soc.*; **1996**; *118*; 9218-9227.
- [88] E. Nicolás, E. Pedroso, E. Giralt; *Tetrahedron Lett.*; **1989**; *30*; 497-500.
- [89] R. Dölling, M. Beyermann, J. Haenel, F. Kernchen, E. Krause, P. Franke, M. Brudel, M. Bienert; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*; **1994**; 853-854.
- [90] J. Cebrán, V. Domingo, F. Reig; *J. Peptide Res.*; **2003**; *62*; 238-244.
- [91] M. Mergler, F. Dick, B. Sax, C. Stähelin, T. Vorherr; *J. Peptide Sci.*; **2003**; *9*; 518-526.
- [92] T. Michels, R. Dölling, U. Haberkorn, W. Mier; *Org. Lett.*; **2012**; *14*; 5218-5221.
- [93] G. Hübener, W. Göhring, H.-J. Musiol, L. Moroder; *Peptide Res.*; **1992**; *5*; 287-292.
- [94] R. L. Noble, D. Yamashiro, C. H. Li; *J. Am. Chem. Soc.*; **1976**; *98*; 2324-2328.
- [95] M. Bienert, E. Klauschenz, K. Nikolics, H. Niedrich; *Int. J. Peptide Res.*; **1982**; *19*; 310-314.
- [96] R. Chen, K. A. Lewis, M. H. Perrin, W. W. Vale; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **1993**; *90*; 8967-8971.
- [97] R. J. Lefkowitz; *Cell*; **1993**; *74*; 409-412.
- [98] L. Oliveira, A. C. M. Paiva, C. Sander, G. Vriend; *Trends Pharmacol. Sci.*; **1994**; *15*; 170-172.
- [99] H. E. Hamm; *J. Biol. Chem.*; **1998**; *273*; 669-672.
- [100] J. Vaughan, C. Donaldson, J. Bittencourt, M. H. Perrin, K. Lewis, S. Sutton, R. Chan, A. V. Turnbull, D. Lovejoy, C. Rivier, J. Rivier, P. E. Sawchenko, W. Vale; *Nature*; **1995**; *378*; 287-292.
- [101] D. E. Grigoriadis, X.-J. Liu, J. Vaughn, S. F. Palmer, C. D. True, W. W. Vale, N. Ling, E. B. De Souza; *Mol. Pharmacol.*; **1996**; *50*; 679-686.
- [102] F. Holsboer; *Spektrum der Wissenschaft*; **1993**; *5*; 50-53.
- [103] M. H. Perrin, C. J. Donaldson, R. Chen, K. A. Lewis, W. W. Vale; *Endo.*; **1993**; *133*; 3058-3061.

- [104] E. B. De Souza; *Psychoneuroendocrinology*; **1995**; 20; 789-819.
- [105] M. H. Perrin, S. Sutton, D. L. Bain, W. T. Berggren, W. W. Vale; *Endo.*; **1998**; 139; 566-570.
- [106] M. H. Perrin, W. H. Fischer, K. S. Kunitake, A. G. Craig, S. C. Koerber, L. A. Cervini, J. E. Rivier, J. C. Groppe, J. Greenwald, S. M. Nielsen, W. W. Vale; *J. Biol. Chem.*; **2001**; 276; 31528-31534.
- [107] J. Klose, K. Fechner, M. Beyermann, E. Krause, N. Wendt, M. Bienert, R. Rudolph, S. Rothmund; *Biochemistry*; **2005**; 44; 1614-1623.
- [108] M. Mutter, S. Vuilleumier; *Angew. Chem.*; **1989**; 101; 551-571.
- [109] M. Mutter, P. Dumy, P. Garrouste, C. Lehmann, M. Mathieu, C. Peggion, S. Peluso, A. Razaname, G. Tuchscherer; *Angew. Chem.*; **1996**; 108; 1587-1591.
- [110] L. J. Qi, A. T. Leung, Y. Xiong, K. A. Marx, A.-B. Abou-Samra; *Biochemistry*; **1997**; 36; 12442-12448.
- [111] M. Beyermann, N. Heinrich, K. Fechner, J. Furkert, W. Zhang, O. Kraetke, M. Bienert, H. Berger; *Br. J. Pharmacol.*; **2007**; 151; 851-859.

Zielstellung

- [112] D. J. Boerema, V. A. Tereshko, S. B. H. Kent; *Biopolymers*; **2008**; 90; 278-286.

Ergebnisse & Diskussion

- [113] P. E. Dawson, M. J. Churchill, M. R. Ghadiri, S. B. H. Kent; *J. Am. Chem. Soc.*; **1997**; 119; 4325-4329.
- [114] F. Albericio, I. Annis, M. Royo, G. Barany (**2003**); Preparation and handling of peptides containing methionine and cysteine in: *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A practical approach* (eds. W. C. Chan, P. D. White), pp. 77-114.
- [115] L. C. Lane; *Anal. Biochem.*; **1978**; 86; 655-664.
- [116] W. Walcher, H. Toll, A. Ingendoh, C. G. Huber; *J. Chromatogr. A*; **2004**; 1053; 107-117.
- [117] H. Liu, B. Xu, M. K. Ray, Z. Shahrokh; *J. Chromatogr. A*; **2008**; 1210; 76-83.
- [118] J. C. Gesquiere, E. Diosis, M. T. Cung, A. Tartar; *J. Chromatogr. A*; **1989**; 478; 121-129.
- [119] W. R. Gray, J. E. Rivier, R. Galyean, L. J. Cruz, B. M. Olivera; *J. Biol. Chem.*; **1983**; 258; 12247-12251.
- [120] T. Nishikawa, Y. Hayashi, S. Suzuki, H. Kubo, H. Ohtani; *Anal. Sci.*; **1996**; 12; 561-564.
- [121] M. Dittmann, M. Sadek, R. Seidel, M. Engelhard; *J. Pept. Sci.*; **2012**; 18; 312-316.
- [122] G. Barany, R. B. Merrifield (**1980**); Analysis, Synthesis and Biology in: *The Peptides* (eds. E. Gross, J. Meienhofer), Vol. 2 Academic Press, New York, pp. 190-208 und deren Referenzen.
- [123] C. Hanay; *Dissertation*; Humboldt-Universität zu Berlin; **1998**.
- [124] M. Goodman, L. Levine; *J. Am. Chem. Soc.*; **1964**; 86; 2918-2922.
- [125] C. Griehl, A. Kolbe, S. Merkel; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*; **1996**; 11; 2525-2529.
- [126] E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent; *J. Am. Chem. Soc.*; **2006**; 128; 6640-6646.

- [127] T. Teruya, T. Tanaka, T. Kawakami, K. Akaji, S. Aimoto; *J. Pept. Sci.*; **2012**; 18; 669-677.
- [128] D. L. Stalling, G. Gille, C. W. Gehrke; *Anal. Biochem.*; **1967**; 18; 118-125.
- [129] P. Hušek, K. Macek; *J. Chromatogr. A*; **1975**; 113; 139-230.
- [130] H. Brückner, D. Becker, M. Lüpke; *Chirality*; **1993**; 5; 385-392.
- [131] H. Frank, W. Woiwode, G. Nicholson, E. Bayer; *Liebigs Ann. Chem.*; **1981**; 1981; 354-365.
- [132] W. C. Johnson Jr.; *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*; **1988**; 17; 145-166.
- [133] J. T. Pelton, L. R. McLean; *Anal. Biochem.*; **2000**; 277; 167-176.
- [134] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price; *Biochim. Biophys. Acta*; **2005**; 1751; 119-139.
- [135] Y. Ohhashi, Y. Hagihara, G. Kozhukh, M. Hoshino, K. Hasegawa, I. Yamaguchi, H. Naiki, Y. Goto; *J. Biochem.*; **2002**; 131, 45-52.
- [136] R. C. Hillig, P. G. Coulie, V. Stroobaut, W. Saenger, A. Ziegler, M. Hülsmeier; *J. Mol. Biol.*; **2001**; 310; 1167-1176.
- [137] M. Gozu, Y. H. Lee, Y. Ohhashi, M. Hoshino, H. Naiki, Y. Goto; *J. Biochem.*; **2003**; 133; 731-736.
- [138] New England BioLabs, IMPACT-TWIN Instruction Manual; *Catalog #E6950S*; Version 1.4 1/06.
- [139] D. Wietfeld, N. Heinrich, J. Furkert, K. Fechner, M. Beyermann, M. Bienert, H. Berger; *J. Biol. Chem.*; **2004**; 279; 38386-38394.

Zusammenfassung & Ausblick

- [140] S. B. H. Kent; *Ann. Rev. Biochem.*; **1988**; 57; 957-989.
- [141] R. C. de L. Milton, S. C. F. Milton, P. A. Adams; *J. Am. Chem. Soc.*; **1990**; 112; 6039-6046.
- [142] I. Coin, M. Beyermann, M. Bienert; *Nat. Protoc.*; **2007**; 2; 3247-3256.

Experimenteller Teil

- [143] U. Piantini, O. W. Sorensen, R. R. Ernst; *J. Am. Chem. Soc.*; **1982**; 104; 6800-6801.
- [144] A. A. Bothner-By, R. L. Stephen, J. M. Lee, C. D. Warren, R. W. Jeanloz; *J. Am. Chem. Soc.*; **1984**; 106; 811-813.
- [145] A. Bax, D. G. Davis; *J. Magn. Reson.*; **1985**; 63; 207-213.
- [146] A. Bax, R. H. Griffey, B. L. Hawkins; *J. Am. Chem. Soc.*; **1983**; 105; 7188-7190.
- [147] A. Bax, S. Subramanian; *J. Magn. Reson.*; **1986**; 67; 565-569.
- [148] L. E. Cammish, S. A. Kates (**2003**); Instrumentation for automated solid phase peptide synthesis in: *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A practical approach* (eds. W. C. Chan, P. D. White), pp. 277-302.
- [149] G. Schnorrenberg, H. Gerhardt; *Tetrahedron*; **1989**; 45; 7759-7764.
- [150] W. C. Chang, P. D. White (**2003**); Basic procedures in: *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A practical approach* (eds. W. C. Chan, P. D. White), pp. 41-76.

- [151] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook; *Anal. Biochem.*; **1970**; 34; 595-598.
- [152] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, Y. Wenqing, W. Schäfer; *Tetrahedron Lett.*; **1989**; 30; 3943-3946.
- [153] Promega, Sequencing Grade Modified Trypsin Protocol.; *Literature #9PIV511*; Revised 12/11.
- [154] R. Houssin, J. Pommery, M.-C. Salan, S. Deweer, J.-F. Goossens, P. Chavatte, J.-P. Hnichart; *J. Med. Chem.*; **2002**; 45; 533-536, Supporting Information.
- [155] G. Loidl, F. Dick, M. Mergler, R. O. Schoenleber; *Adv. Exp. Med. Biol.*; **2009**; 611; 163-164.
- [156] M. A. Ward, T. E. McCarthy, J. S. Nishimura; *Anal. Biochem.*; **1967**; 20; 275-281.

8. BILDNACHWEIS

- [1] H. Fabian, H. Huser, D. Narzi, R. Misselwitz, B. Loll, A. Ziegler, R. A. Böckmann, B. Uchanska-Ziegler, D. Naumann; *J. Mol. Biol.*; **2008**; 376; 798-810. (bearbeitet)
- [2] C.-S. Hee, H. Fabian, B. Uchanska-Ziegler, A. Ziegler, B. Loll; *Biophysical Chemistry*; **2012**; 167; 26-35.
- [3] B. Briand; *Dissertation*; Humboldt-Universität zu Berlin; **2009**.
- [4] J. Spiessa, F. M. Dautzenberga, S. Sydowa, R. L. Haugerb, A. Rühmanna, T. Blanka, J. Radulovic; *Trends Endocrinol. Metab.*; **1998**; 9; 140-145. (bearbeitet)
- [5] S. Jähnichen; **24.04.2006**; *Activation cycle of G-proteins by G-protein-coupled receptors*. (URL = <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6d/GPCR-Zyklus.png>)

9. ANHANG

9.1. Abkürzungsverzeichnis

Die Aminosäuren wurden in üblicher Weise im Ein- bzw. Dreibuchstabencode abgekürzt.

Ø	Durchschnittliche Masse
β_2 -M	β_2 -Mikroglobulin
ΨPro	Pseudoprolin
δ	Chemische Verschiebung
A	N-terminales Segment vom β_2 -M
A-OH	Säure des Thioesters A-SR
A-SR	Acetamidophenyl-Thioester des N-terminalen Segmentes A vom β_2 -M
A(-18)	Säure des Thioesters A-SR um die Masse 18 Da leichter
(p)-Aatp	(para)-Acetamidothiophenol
ABC	Lineares β_2 -M, Ligations-Produkt von A-SR und BC
ABC_1	Früher eluierendes ABC-Ligations-Produkt
ABC_2	Später eluierendes ABC-Ligations-Produkt
ABC_1 ^{Alk}	Früher eluierendes alkyliertes ABC-Ligations-Produkt
ABC_2 ^{Alk}	Später eluierendes alkyliertes ABC-Ligations-Produkt
ABC	Ammonium-Bicarbonat
Acm	Acetamidomethyl
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AGC	Automatic gain control
AS	Aminosäure
Äq.	Äquivalente
B	Mittleres Segment vom β_2 -M
B*	Mittleres Segment vom β_2 -M mit als Thioazolidin geschütztem N-terminalen Cystein
B*-SR	Acetamidophenyl-Thioester des mittleren Segmentes vom β_2 -M mit als Thioazolidin geschütztem N-terminalen Cystein
BC	Verknüpftes C-terminales Segment vom β_2 -M mit dem mittleren Segment
B*C	Verknüpftes C-terminales Segment vom β_2 -M mit dem mittleren Segment mit als Thioazolidin geschütztem N-terminalen Cystein
BIRD	Bilinear Rotational Decoupling
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
BSA	Bovine serum albumin

Bz-LN-SR	Benzoyl-LN-acetamidophenyl-Thioester
C	C-terminales Segment vom β_2 -M
CD	Circulare dichroism
CID	Collision-induced dissociation
ClTrt-Cl-Harz	TentaGel-S-2-Chlortrityl-chlorid-Harz
COSY	Correlation spectroscopy
CRF1	Corticotropin releasing factor receptor type 1
CRF1 _{lin/expr}	Lineares CRF1-Konstrukt mit exprimiertem ECL2
CRF1 _{zykl}	Zyklisches CRF1-Konstrukt
CRH	Corticotropin-releasing Factor Hormon
cycloTemplat	Zyklisches Templat
d	Dublett
DCM	Dichlormethan
Dde	(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTGS	Deuteriertes Triglycinsulfat
DTT	Dithiothreitol
DQF	Double quantum filtered
DRA	Dialysebedingte Amyloidosis
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECD	Extrazelluläre Domäne
ECD1	Extrazelluläre Domäne 1 des Corticotropin-releasing Faktor Rezeptor Typ 1, der Rezeptor-N-Terminus
ECD2	Extrazelluläre Domäne 2 des Corticotropin-releasing Faktor Rezeptor Typ 1, ECL1
ECD3	Extrazelluläre Domäne 3 des Corticotropin-releasing Faktor Rezeptor Typ 1, ECL2
ECD _{expr} 3	Exprimierte extrazelluläre Domäne 3 des Corticotropin-releasing Faktor Rezeptor Typ 1, ECL _{expr} 2
ECD4	Extrazelluläre Domäne 4 des Corticotropin-releasing Faktor Rezeptor Typ 1, ECL3
ECL1	Extrazellulärer Loop 1 des Corticotropin-releasing Faktor Rezeptor Typ 1
ECL2	Extrazellulärer Loop 2 des Corticotropin-releasing Faktor Rezeptor Typ 1

ECL _{expr} 2	Exprimierter extrazellulärer Loop 2 des Corticotropin-releasing Faktor Rezeptor Typ 1
ECL3	Extrazellulärer Loop 3 des Corticotropin-releasing Faktor Rezeptor Typ 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPL	Expressed Protein Ligation
ESI	Electron spray ionisation
Ether	Diethylether
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FA	Ameisensäure
FID	Flammen-Ionisations-Detektor
FT	Fouriertransformation
G-Proteine	GTP bindendes Protein
GC	Gaschromatografie
Gn•HCl	Guanidin-Hydrochlorid
GPCR	G-Protein coupled receptor
GSH	reduziertes Gluthation
GSSG	oxidiertes Gluthation
GTP	Guanosintriphosphat
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-Tetrafluoroborat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFIP	Hexafluorisopropanol
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMBC	Proton detected heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Proton detected heteronuclear multiple quantum coherence
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
HOSu	N-Hydroxysuccinimid
HPLC	High performance liquide chromatography
IMAC	Immobilized metal-ion affinity chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
LC	Liquid chromatography
Loop 1	ECL1, ECD2 des Corticotropin-releasing Faktor Rezeptors Typ 1
Loop 2	ECL2, ECD3 des Corticotropin-releasing Faktor Rezeptors Typ 1
Loop _{expr} 2	ECL _{expr} 2, ECD _{expr} 3 des Corticotropin-releasing Faktor Rezeptors Typ 1
Loop 3	ECL3, ECD4 des Corticotropin-releasing Faktor Rezeptors Typ 1
m	Multiplett
M(1-6)-SR	Acetamidophenyl-Thioester der Modell-Peptide 1-6
M(1-6)-OH	C-terminale L-Säuren der Modell-Peptid-Thioester 1-6
m(1-6)-OH	C-terminalen D-Säuren der Modell-Peptid-Thioester 1-6

M(1-6)(-18)	Um 18 Da leichtere Verbindung als die Säure der Modell-Peptid-Thioester
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisations-ToF/ToF-MS
MESNA	2-Mercaptoethansulfonat-Natrium
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex
Mhx	Maleimidohexansäure
Mhx-OSu	Maleimidohexansäure-N-hydroxysuccinimid-Ester
Mmt	(4-Methoxyphenyl)diphenylmethyl
MPAA	4-(Carboxymethyl)-thiophenol
MS	Mass spectrometry
Msc	N-Methylsulfonylethoxycarbonyloxy
<i>Mth RIR 1</i>	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum rir 1</i>
MWCO	Molecular weight cut off
NCL	Native chemische Ligation
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
NS	Niederschlag
q	Quadruplett
rek.	rekombinant
Rel. Int.	Relative Intensität
ROESY	Rotating frame nuclear overhauser effect spectroscopy
RP	Reversed-phase
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SPA	Scintillation proximity assay
SPCL	Solid phase chemical ligation
SPPS	Solid phase peptide synthesis
Srt A	Sortase A
<i>Ssp Dna B</i>	<i>Synechocystis dnaB</i>
t	Triplett
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TCEP•HCl	Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid
Temp	Templat
TFA	Trifluoressigsäure
Thz-OH	Thioazolidin-4-carbonsäure
TIPS	Triisopropylsilan
ToF	Time of flight
Tris•HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid
t_R	Retentionszeit
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure

Trt	Trityl
UPLC	Ultrahigh performance liquid chromatography
UV	Ultraviolett
WT	Wild type
Z	Benzyloxycarbonyl

9.2. Danksagung

Ausdrücklicher Dank geht an meinen Betreuer Dr. Michael Beyermann für die vielseitigen synthetischen, methodischen und analytischen Aspekte meiner Doktorarbeit am FMP, weiterhin für sein stetes Interesse und seine Diskussionsbereitschaft. Prof. Dr. Oliver Seitz sei gedankt für die Betreuung meine Promotion von Seiten der Humboldt-Universität zu Berlin.

Der finanziellen Unterstützung sei der DFG und dem FMP und der Ermöglichung der Teilnahme an diversen interessanten nationalen und internationalen Konferenzen gedankt.

Außerdem sei folgenden Personen für die reichhaltige Unterstützung gedankt:

- Annerose Klose für die Hilfe bei der Synthese einiger Chargen der Segmente vom β_2 -M, der Bausteine für die Rezeptor-Konstrukte und dem teilweisen Aufbau letzterer,
- Bernhard Schmikale für die Synthesen der C-terminalen L-/D-Säuren der Modellpeptide,
- Dagmar Krause für die Reinigung besagter L-/D-Säuren und die Bereitschaft ihr Wissen über die RP-HPLC zu teilen,
- Dr. Nadja Heinrich und Dagmar Michl für die Planung und Ausführung der funktionellen Bioassays,
- Heike Nikolenko für die Einführung in die CD-Spektroskopie und die Gesprächsbereitschaft über technische HPLC-Probleme,
- Bernhard Geltinger für die Einarbeitung in das Themengebiet der Expression und der Vorarbeiten der EPL mit dem pTWIN2-Vektor,
- Dr. Kirill Piotukh für die Biosynthese der Sortase A,
- den analytischen Abteilungen, im speziellen der AG Massenspektrometrie (Dr. Ebehard Krause, Dr. Michael Schümann & Heike Stephanowitz), zudem der AG NMR in Lösung, (Dr. Peter Schmieder & Monika Beerbaum) für die Messungen und der interessierten Diskussion der Ergebnisse,
- Marianne Dreißigacker für die häufige administrative Unterstützung,
- dem Klima, der Hilfsbereitschaft und interaktiven Diskussionen im Haus, hervorgehoben seien hier Angelika Ehrlich, Dr. Christian Hoppmann.

Der Kooperation und Ausführung der stereochemischen Untersuchungen von Aminosäuren per GC und der entsprechenden Derivatisierung einen Dank an René Jarling vom GFZ Potsdam. Für das Teilen seines umfangreichen Wissens über das β_2 -Mikroglobulin, FTIR-Spektroskopie und β -Faltblatt-Strukturen, sowie die Ausführung sämtlicher FTIR-Messungen sei Dr. Heinz Fabian vom Robert Koch-Institut gedankt. Möge er in Frieden ruhen.

Ferner sei Dank an die fleißigen Korrektoren Dr. Kornelia Gawlitza, Josephine Schmalisch, Dr. Robert Vallée und René Jarling gesagt.

Ohne die Unterstützung, Aufmunterungen, Ablenkungen und den Glauben an mich durch meine Familie, wäre dies nicht möglich gewesen. Vielen Dank an dieser Stelle. Besonderer Dank geht an René Jarling der mir in allen Situationen aufopferungsvoll zur Seite stand, mich durch sein hartnäckiges Hinterfragen ermutigt hat und mir voll und ganz eine einmalige Unterstützung ist, die seines gleichen sucht.

9.3. Veröffentlichungen

PUBLIKATIONEN

- S. Abel, M. Beyermann; „ β_2 -Microglobulin: A „difficult“ protein“ *Proceedings of the 32nd European Peptide Symposium*; **2012**; *Athen, Greece*; 648-649.
- S. Abel, B. Geltinger, D. Schwarzer, M. Beyermann; „*Strategy for the Synthesis of Isotope-Labeled Branched Protein Mimics*“ *Proceedings of the 23rd American Peptide Symposium*; **2013**; *Hawai‘i, HI, USA*; 214-215.

VORTRÄGE

- „ β_2 -Microglobulin: A tricky protein synthesis“ im Rahmen des wissenschaftlichen Austausches am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie im Forschungsverbund Berlin e.V. (FMP).

POSTER

- S. Abel, M. Beyermann; „ β_2 -Microglobulin: A difficult protein“ *32nd European Peptide Symposium*; **02.-07. Sept. 2012**; *Athen, Greece*.
- S. Abel, B. Geltinger, D. Schwarzer, M. Beyermann; „*Protein synthesis by the combination of expressed protein ligation & chemical synthesis*“ *11th German Peptide Symposium*; **18.-21. März 2013**; *München, Deutschland*.
- S. Abel, B. Geltinger, D. Schwarzer, M. Beyermann; „*Strategy for synthesis of isotope-labeled branched protein mimics*“ *23rd American Peptide Symposium*; **22.-27. Juni 2013**; *Hawai‘i, HI, USA*.

9.4. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Sabine Abel, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe. Es wurden keine weiteren Quellen oder Hilfsmittel als die hier angegebenen verwendet.